

**Entwicklung eines Massenspektrometrie-basierten Verfahrens  
zur Quantifizierung von HIV-Strukturproteinen und deren  
Stöchiometrie für neue analytische Anwendungen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Luise Luckau  
aus Bernburg (Saale)

1. Referentin: Professorin Dr. Petra Mischnick  
2. Referent: Professor Dr. Sven-Erik Behrens  
eingereicht am: 24.04.2019  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 02.07.2019

Druckjahr 2019

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Hashemi P., Luckau L., Mischnick P., Schmidt S., Stosch R., Wunsch B.: Biomacromolecules as tools and objects in nanometrology - current challenges and perspectives. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, 409:5901-5909

## **Tagungsbeiträge**

Luckau L., Henrion A.: Mass spectrometry-based measurement of HIV-amounts and -stoichiometries, Protein and Peptide Therapeutics and Diagnostics: Research and Quality Assurance International Workshop (PPTD), Chengdu, China (2018), Vortrag und Poster

Luckau L., Henrion A., Mischnick P., Güttler B.: Precise quantification of HIV proteins by isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) for applications in HIV diagnostics, 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Kiel, Deutschland (2017), Poster

Luckau L.: Measurement of HIV viral load and level of maturation by isotope dilution mass spectrometry, 7. Braunschweiger Jungchemiker Tagung, Braunschweig, Deutschland (2016), Vortrag

## **Posterbeiträge**

Luckau L., Henrion A., Mischnick P., Güttler B.: Precise quantification of HIV proteins by isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) for applications in HIV diagnostics, 11<sup>th</sup> European Summer School "Advanced Proteomics", Brixen, Italien (2017)

Luckau L., Henrion A., Mischnick P., Güttler B.: Measurement of HIV viral load and level of maturation by isotope-dilution mass spectrometry, 6<sup>th</sup> Summer School on Infection Research, Buchenau, Deutschland (2016)



„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,  
das Erforschliche erforscht zu haben und  
das Unerforschliche zu verehren.“

- J. W. von Goethe -



## Kurzfassung

In der Virusdiagnostik und -forschung ist die Verfügbarkeit von genau charakterisierten viralen Referenzmaterialien von Bedeutung, da sie vor allem die Messgenauigkeit verbessern. Ein Ziel ist die genaue Quantifizierung der für den Aufbau von Viren relevanter Biomoleküle, der viralen Nukleinsäure und der funktionalen viralen Proteine, sowie deren Verhältnisse.

Die derzeit metrologisch genauesten Methoden im Bereich der Nukleinsäure-Quantifizierung ist die digitale PCR (z. B. *droplet digital PCR*: ddPCR) und in der Protein-Quantifizierung die Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie (IDMS). Beide Verfahren wurden in dieser Arbeit für die HIV-Quantifizierung auf ein *in vitro* hergestelltes Virusmaterial angewendet. Bei dem direkten Vergleich beider Methoden bezüglich der Wiederholbarkeit von Messungen erreichte die ddPCR eine technische Präzision von  $\pm 0,7\%$  und die IDMS von  $\pm 2,5\%$ . Dagegen konnte mit der IDMS aufgrund der internen Standardisierung mit  $\pm 2\%$  eine bessere Reproduzierbarkeit der Komplettanalysen im Vergleich zur ddPCR mit  $\pm 3,8\%$  erzielt werden.

Auf der Basis von ersten Peptide-Mapping-Analysen des HIV-Materials wurde das IDMS-Verfahren bezüglich der Quantifizierung des Gag-Polypeptids (GAGp55), das alle viralen Strukturproteine als Vorläuferprotein enthält, etabliert. Dafür wurden verschiedene isotopenmarkierte Peptid- und Protein-Standards getestet und die Vollständigkeit der Proteolyse validiert, um eine genaue Quantifizierung zu gewährleisten. Da die Quantifizierung von Viren als komplexe Strukturen eine Herausforderung darstellt, auch bezogen auf den verwendeten Standard, wurde ein Lysin- und Arginin-isotopenmarkiertes HIV-Material mittels SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) hergestellt, das chemisch genauso aufgebaut ist wie das natürliche HIV-Material. Dieses Material kann nach umfassender Charakterisierung in Zukunft für die relative und absolute Quantifizierung eingesetzt werden.

Das gefundene Mengenverhältnis von MAp17, CAp24 und p6, die alle aus dem Vorläuferprotein GAGp55 stammen, weicht vom erwarteten äquimolaren Verhältnis ab, was auf alternative Translationsmechanismen rückzuführen ist. Aufgrund eines IRES (*internal ribosomal entry site*)-abhängigen Translationsmechanismus können MAp17-trunkierte Gag-Proteinvarianten entstehen, weshalb die MAp17-Menge im Vergleich zu CAp24 um  $\sim 20\%$  reduziert ist. Die Ursache für um  $\sim 30\%$  reduziertes p6 im Vergleich zu CAp24 ist womöglich ein RNA-Sequenzmotiv, das bekannterweise die ribosomale Leserahmenverschiebung für die Gag-Pol-Synthese verursacht. Für den quantitativen Vergleich zwischen CAp24- und RNA-Menge wurden sechs unabhängige Proben, die zufällig recht unterschiedliche Protein- und RNA-Gehalte aufwiesen, mittels IDMS und ddPCR gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Protein-Menge mit der RNA-Menge bis zu einer Sättigung zunahm, wobei in der quasilinearen Phase bereits ein deutlicher Protein-Überschuss von  $2,5 \times 10^2$  Kopien vorliegt, abgeschätzt unter der Annahme, dass in einem Virus-Partikel je zwei RNA-Moleküle und durchschnittlich 2400 Gag-Moleküle enthalten sind.





## Abstract

The availability of well characterized viral reference materials is of great importance for the estimation of viral load and for scientific issues. Such materials greatly improve measurement accuracy. The aim of this work is the accurate quantification and the determination of the stoichiometric ratio of all viral biomacromolecules. These are relevant for viral composition and consist of the viral nucleic acid and the functional viral proteins.

To date, the most accurate measurement methods in the fields of nucleic acid and protein quantification are droplet digital PCR (ddPCR) and isotope dilution mass spectrometry (IDMS), respectively. Both methods were used for the quantification of HIV in an *in vitro* produced viral material. The direct comparison of both methods, regarding the repeatability of measurements, demonstrated a technical precision of  $\pm 0.7$  % for ddPCR and of  $\pm 2.5$  % for IDMS. In contrast, IDMS could reach a higher reproducibility, due to its incorporation of an internal standard, with  $\pm 2$  % compared to  $\pm 3.8$  % when using ddPCR.

Based on first peptide mapping analyses of the HIV material, an IDMS approach was developed for the quantification of the Gag polyprotein precursor (GAGp55), which included all structurally relevant protein components. For this, different isotopically labeled peptide and protein standards were tested and an assessment of the completeness of proteolysis, which is essential to achieve accurate quantitative results, was performed. The quantification of biomolecular assemblies, such as a virus, via their complex biomolecular structures, in complex matrices also provides a great challenge in the selection and use of an ideal calibration standard. To address this, a labeled virus material, in which every lysine and arginine amino acid in the virus proteins were isotopically labelled, was prepared by SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture). This material was chemically equivalent to the natural material and if fully characterized can be used for relative and absolute quantification approaches. The quantified stoichiometry of the GAGp55 derived structural proteins MAp17, CAp24 and p6 differ from the expected equimolar ratios due to alternative translation mechanisms. Based on an IRES- (internal ribosomal entry site) dependent translation mechanism, a MAp17 truncated Gag protein can be produced resulting in a reduction of  $\sim 20$  % in the amount of MAp17 compared to CAp24. The observation of a  $\sim 30$  % reduction in the amount of p6 compared to CAp24 is likely a result of an RNA sequence motif, which is known to cause the programmed ribosomal frameshift resulting in Gag-Pol synthesis. Six independent HIV samples were measured by IDMS and ddPCR to compare the relationship between the CAp24 protein and RNA amount. The measured amounts of protein and RNA differed significantly from that predicted by theory. While the amount of protein was observed to increase, linearly at first until reaching saturation, with the amount of RNA present, a protein excess of  $2.5 \times 10^2$  was observed. This is in contrast to the assumption that one virus particle contains 2 RNA and on average 2400 Gag molecules.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Motivation .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>5</b>
2.1. Humanes Immunschwächevirus (HIV).....	5
2.1.1. Krankheitsverlauf, Diagnostik & Therapie.....	5
2.1.2. Genomstruktur und Morphologie von HIV-1 .....	7
2.1.3. Replikationszyklus.....	10
2.1.4. Genetische Diversität und Klassifizierung von HIV-1 .....	13
2.2. Nukleinsäure-Quantifizierung mittels PCR.....	14
2.2.1. Quantitative real-time PCR.....	14
2.2.2. Digitale PCR .....	15
2.3. Massenspektrometrie basierte Proteomics .....	16
2.3.1. Protein-Quantifizierungsstrategien .....	17
2.3.2. Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie .....	20
2.3.3. Aufbau und Anwendung des Orbitrap Elite Massenspektrometers .....	22
<b>3. Experimenteller Teil .....</b>	<b>27</b>
3.1. Zellkultur und virologische Arbeiten.....	27
3.1.1. Zellkultivierung und Passagierung.....	27
3.1.2. Zellzahlbestimmung .....	27
3.1.3. Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	28
3.1.4. Virusexpansion und Verarbeitung des HIV-Materials.....	28
3.1.5. Herstellung von isotoopenmarkiertem Virusmaterial.....	29
3.1.6. Virustitration (TCID <sub>50</sub> -Assay) .....	29
3.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	30

3.3.	Nukleinsäure-Analytik.....	31
3.3.1.	Extraktion von viraler RNA .....	31
3.3.2.	cDNA-Synthese – Reverse Transkription .....	31
3.3.3.	Photometrische Analyse von Nukleinsäuren .....	33
3.3.4.	qPCR-Assay .....	33
3.3.5.	ddPCR-Assay.....	34
3.3.6.	Agarose-Gelelektrophorese.....	36
3.4.	Probenvorbereitung für die Proteinanalytik.....	36
3.4.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	36
3.4.2.	Proteolyse im Gel.....	37
3.4.3.	Proteolyse in Lösung.....	37
3.4.4.	Automatisierung der Proteolyse in Lösung .....	38
3.4.5.	Festphasenextraktion als Entsalzungsmethode.....	40
3.4.6.	Reverse Phase- und Kationenaustausch-Chromatographie .....	40
3.5.	Proteinanalytik mittels Western-Blot .....	41
3.6.	Proteinanalytik am LC-ESI-Orbitrap Elite Gerätesystem.....	42
3.6.1.	Analyseverfahren zur Quantifizierung von HIV-Proben.....	43
3.6.2.	Tandem-Massenspektrometrie (MSMS) .....	43
3.6.3.	Messung und Auswertung von Peptide Mapping Experimenten .....	44
3.6.4.	Analyse intakter Proteine .....	45
3.7.	Quantitative Aminosäureanalytik von Referenzmaterialien .....	46
3.8.	Ermittlung der Messunsicherheit nach dem GUM.....	48

---

<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>51</b>
4.1. Charakterisierung des Virusmaterials .....	51
4.1.1. Elektronenmikroskopische Analyse .....	51
4.1.2. Analyse des Proteinprofils .....	52
4.2. Validierung von HIV-Protein-Referenzmaterialien .....	58
4.2.1. Gag-Polypotein .....	58
4.2.2. Capsidprotein .....	64
4.2.3. Nukleocapsidprotein .....	68
4.3. Auswahl von HIV-Peptiden und Referenzmaterialien zur HIV-Quantifizierung .....	70
4.3.1. Peptide für die Matrix-Quantifizierung .....	72
4.3.2. Peptide für die Capsid-Quantifizierung .....	72
4.3.3. Peptide für die Nukleocapsid-Quantifizierung .....	73
4.3.4. Peptide für die p6-Quantifizierung .....	75
4.3.5. Peptide mit Protease-Schnittstelle für die GAGp55-Quantifizierung .....	76
4.3.6. Peptid-Referenzmaterialien .....	78
4.4. Massenspektrometrische Methodenentwicklung .....	79
4.4.1. Massenspektrometrisches Quantifizierungsverfahren von HIV-Proteinen .....	79
4.4.2. Validierung der Proteolyse im HIV-Probenmaterial .....	83
4.5. ddPCR-Methodenentwicklung zur HIV-RNA-Quantifizierung .....	88
4.5.1. Optimierung der cDNA-Synthese .....	88
4.5.2. Primer- und Assay Design .....	90
4.5.3. Optimierung der Assay-Parameter .....	92
4.6. Präzision des IDMS- und ddPCR-Verfahrens .....	96
4.7. Analyse der Gag-Polypotein-Stöchiometrie .....	100
4.8. Verhältnis zwischen Cap24/RNA-Level und infektiösem Titer .....	104
4.9. Absolutes SILAC für isotoopenmarkiertes HIV-Referenzmaterial .....	108
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>113</b>

<b>6. Anhang.....</b>	<b>117</b>
6.1. Abkürzungsverzeichnis .....	117
6.2. Abbildungsverzeichnis.....	120
6.3. Tabellenverzeichnis.....	121
6.4. Materialien .....	122
6.4.1. Zelllinien und Zellkulturmedien .....	122
6.4.2. HIV-Stamm .....	123
6.4.3. Aminosäuren.....	124
6.4.4. Peptide.....	125
6.4.5. Proteine.....	126
6.4.6. Antikörper.....	127
6.4.7. Oligonukleotide .....	127
6.4.8. Chemikalien .....	127
6.4.9. Kits.....	129
6.4.10. Puffer und Lösungen .....	130
6.4.11. Geräte .....	133
6.4.12. Verbrauchsmaterialien und Laborbedarf.....	135
6.4.13. Software und Datenbanken .....	137
6.5. Ergebnisteil .....	137
6.5.1. HIV-Inaktivierung.....	137
6.5.2. Precursor- und Fragmentionen.....	140
 <b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	 <b>141</b>
 <b>Danksagung .....</b>	 <b>157</b>
 <b>Curriculum Vitae .....</b>	 <b>159</b>

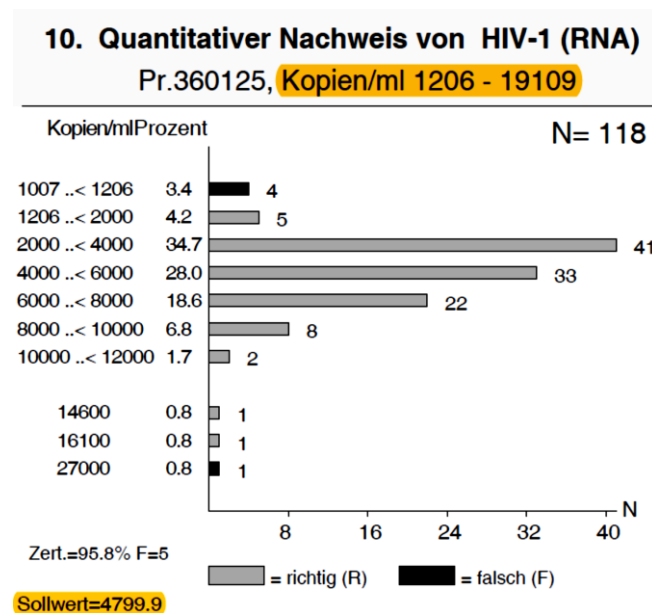
## 1. Einleitung und Motivation

Das humane Immunschwächevirus (HIV, *human immunodeficiency virus*) hat sich seit der Entdeckung im Jahr 1983 weltweit ausgebreitet<sup>1,2</sup> und spielt immer noch eine wesentliche Rolle im Bereich der Diagnostik und Therapie, als auch in der Forschung, da bis heute keine Heilung der Erkrankung möglich ist<sup>3</sup>. Bei erfolgter Diagnose einer HIV-Infektion und anschließender Therapie müssen die Patienten ein Leben lang und in regelmäßigen Abständen ihren Krankheitsverlauf über Blutkontrollen überprüfen lassen, um den Gesundheitszustand und gegebenenfalls ein Therapieversagen rechtzeitig festzustellen<sup>4,5</sup>. Dafür wird u.a. die HIV-Viruslast in RNA-Kopien pro mL Blutplasma bestimmt<sup>5</sup>. Die quantitative real-time PCR (qPCR, *polymerase chain reaction*) ist die klinische Standardmethode für die Nukleinsäure-Quantifizierung von Viren und Bakterien, so auch für das HI-Virus<sup>6–8</sup>.

Dabei sind vertrauenswürdige, reproduzierbare und vor allem vergleichbare Messergebnisse für zuverlässige ärztliche Befunde und Diagnosen bedeutend für die Gesundheit der Patienten<sup>9</sup>. Vor diesem Hintergrund ist in Deutschland die Qualitätssicherung der klinischen Messverfahren in der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen“ (Rili-BÄK) gesetzlich geregelt<sup>10</sup>. Danach müssen alle klinischen Laboratorien an regelmäßigen Vergleichsmessungen (Ringversuchen) teilnehmen und für eine erfolgreiche Teilnahme Ergebnisse im Bereich der zulässigen Abweichung um den Zielwert der Versuchsproben liefern. Ziel der Bundesärztekammer ist es, bestenfalls für jeden klinischen relevanten Parameter einen unabhängigen und rückgeführten Referenzwert bereit zu stellen, woran die Laboratorien ihr verwendetes Messverfahren validieren können. Diese Bestimmung der Referenzwerte erfolgt mit Primärmethoden (Referenzmethoden). Nach der Definition des Consultative Committee for Amount of Substance (CCQM) beschreibt eine Primärmethode eine Methode, die die höchsten metrologischen Qualitäten besitzt, deren Funktionsweise vollständig beschrieben und verstanden ist und für die ein vollständiges Messunsicherheits-Budget in SI-Einheiten erstellt werden kann<sup>11</sup>.

Die Bestimmung der HIV-Viruslast im Blut gehört zu den klinisch bedeutenden Parametern für HIV-Infizierte und ist auch in der Rili-BÄK gelistet. Daraus geht hervor, dass klinische Testlaboratorien für die externe Qualitätskontrolle dazu verpflichtet sind, in halbjährigen Intervallen an Ringversuchen teilzunehmen, um die Richtigkeit der verwendeten qPCR-Methoden zur HIV-Viruslast-Bestimmung validieren zu können<sup>10</sup>. Da nach derzeitigem Stand für die quantitative Nukleinsäure-Analytik keine primären Referenzmaterialien oder Referenzmessverfahren zur Verfügung stehen<sup>12</sup>, muss die Zielwert-Ermittlung der eingesetzten Versuchsproben

für die Ringversuche methodenabhängig erfolgen<sup>10</sup>. Entsprechend werden Sollwerte (Konsensus-Werte) für die Auswertung der Ringversuchsergebnisse ermittelt und auch die Akzeptanzgrenzen oder die zulässige Abweichung basieren auf methodenabhängigen Grenzen. Die aktuell zulässige Abweichung für die HIV-RNA-Konzentrationsbestimmung entspricht einem Intervall von  $\pm 0,6 \log_{10}$  vom dekadisch logarithmierten Sollwert<sup>10</sup>. Das bedeutet, dass eine Messung der RNA-Konzentration erst bei einer 4-fachen Abweichung vom Sollwert als signifikant abweichend und in Ringversuchen als falsch eingeordnet wird. Dies deutet auf die Variabilität der quantitativen PCR-Messverfahren hin, was auch anhand von Ergebnissen aus verschiedenen Ringversuchen deutlich wird<sup>13,14</sup>. Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für eine Ringversuchsauswertung zum Virusgenom-Nachweis von HIV-1-RNA für eine HIV-Versuchsprobe<sup>13</sup>.



**Abbildung 1: Ergebnisse eines Ringversuchs zur quantitativen Bestimmung von HIV-1.**

Virusgenom-Nachweis PCR- / NAT- HIV-1 (360), Probe 360125, März 2018, durchgeführt von INSTAND<sup>13</sup>.

Vor allem die Verwendung verschiedener Testsysteme bzgl. des Assay-Designs verursacht Varianzen in den Messergebnissen<sup>8,15</sup>. Die quantitative Analyse von RNA-Viren ist dabei vor allem abhängig von der Effizienz der RNA-Extraktion und von der anschließenden Reversen Transkription der RNA in cDNA, die vor allem von den verwendeten Reagenzien beeinflusst wird<sup>16-18</sup>. Zudem können unterschiedliche Primer- und Sonden-Paare sowie die Auswahl der Ziel-Gene die Ergebnisse von qPCR-Messungen beeinflussen<sup>15</sup>. Im Fall von HIV spielt zudem die hohe genetische Variabilität eine Rolle und die damit verbundene Fähigkeit der Test-



systeme, die verschiedenen HIV-1 Subtypen gleichermaßen zu detektieren. Auch die Verwendung von verschiedenen externen Standards trägt zur Variabilität der qPCR-Messungen zwischen den Laboratorien bei<sup>8</sup>.

Für HIV-1, aber auch für andere Viren wie Hepatitis B+C, Zytomegalie und Ebola stehen internationale WHO-Standards zur Verfügung, die als internationale-konventionelle Kalibratoren einzuordnen sind<sup>19</sup>. Sie sind nicht SI-rückgeführt und deshalb von geringerer Ordnung bezogen auf die metrologische Rückführbarkeit und werden in willkürlichen internationalen Einheiten (*international unit*, IU) ohne Messunsicherheit angegeben<sup>19</sup>. Obwohl die Verwendung von kommerziellen Assays zusammen mit internationalen Standards die Variabilität zwischen Ergebnissen verschiedener Laboratorien reduziert, bleiben dennoch Herausforderungen bezüglich der Vergleichbarkeit von Messergebnissen bestehen<sup>12,20,21</sup>. Auch für die Charakterisierung von Referenzmaterialien werden Messverfahren höherer metrologischer Ordnung benötigt, um eine bessere Rückführbarkeit der Materialien zu gewährleisten<sup>22</sup>.

Die digitale PCR (dPCR) ist eine technologische Weiterentwicklung zur qPCR und wird in der Literatur als potentiell Referenzmessverfahren höherer Ordnung für die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration von Erregern beschrieben, da eine absolute Quantifizierung des Analyten ohne Verwendung von externen Standards möglich ist<sup>12,23</sup>. Sie ist im Vergleich zur qPCR weniger anfällig gegenüber Matrix-Effekten bzw. Inhibitoren<sup>24,25</sup>, weshalb Verbesserungen bezüglich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit von Messergebnissen der Nukleinsäure-Bestimmung bereits gezeigt werden konnten<sup>26–28</sup>. Für diagnostische Standardmessungen ist dieses Verfahren noch zu kostenintensiv, kann aber für spezielle Fragestellungen wie z.B. die Messung der persistenten HIV-Infektion, d. h. die integrierte virale DNA als Provirus, von Vorteil sein<sup>29,30</sup>. Auch für die Quantifizierung von Referenzmaterialien wird die dPCR-Technologie genutzt<sup>31–33</sup>. Die Verwendung von gut charakterisierten Referenzmaterialien ist unabhängig vom verwendeten quantitativen PCR-System für die molekulare Diagnostik von Erregern bedeutend, um die Richtigkeit eines Assays zu validieren<sup>34,35</sup>. Die dPCR zeichnet sich zwar durch ihre hohe Präzision, Robustheit und Reproduzierbarkeit bezüglich der direkten DNA-Quantifizierung aus, dennoch löst das Verfahren nicht das Problem, inwieweit Substanzverluste während der Probenvorbereitung zu systematischen Fehlern beitragen<sup>36</sup>. Die tatsächlichen Ausbeuten vor allem bei der RNA-Extraktion und bei der cDNA-Synthese sind jeweils nicht bekannt, weshalb keine Rückschlüsse auf die tatsächliche RNA-Konzentration in der Ursprungsprobe gezogen werden können.

Im Bereich der Protein-Analytik gilt die Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie (*isotope dilution mass spectrometry*, IDMS) als ein anerkanntes Primärverfahren<sup>37,38</sup> und zeichnet sich durch Ergebnisse hoher Richtigkeit, Präzision und Vergleichbarkeit von Messergebnissen mit kleinster Messunsicherheit aus<sup>39–42</sup>. Dies wird vor allem durch die interne Standardisierung

durch das Konzept der Isotopenverdünnung erreicht. Die Quantifizierung des Analyten erfolgt dabei durch Zugabe eines isotopenmarkierten Standards bekannter Konzentration, der chemisch analog aufgebaut ist. Nur einzelne Aminosäuren sind durch die schwereren Isotope  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markiert. Da Analyt und Standard die gleichen chemischen und physikochemischen Eigenschaften aufweisen, zeigen sie das gleiche Verhalten während der Probenvorbereitung wie z.B. in der chromatographischen Trennung oder während der massenspektrometrischen Detektion (z. B. gleiche Ionenausbeute). Erst im Massenspektrum sind sie aufgrund der Massenverschiebung unterscheidbar. Im Gegensatz zur dPCR werden Fehler während der Probenvorbereitung durch die Isotopenverdünnung kompensiert, weshalb die Wiederfindungsrate in der IDMS eine untergeordnete Rolle spielt. Im Gegenzug erreicht die Massenspektrometrie nicht die notwendige Sensitivität wie sie für therapierte Patienten relevant ist.

Die Idee ist, beide Verfahren dPCR und IDMS für das Beispiel HIV zu etablieren, anzuwenden und zu vergleichen. Durch die Kombination der derzeit genauesten Messverfahren aus der Nukleinsäure-Analytik (dPCR) und aus der Proteinanalytik (IDMS) könnte insgesamt eine genauere Charakterisierung von viralen Referenzmaterialien erfolgen, die in der Virusanalytik, aber auch für Fragestellungen in der Forschung eingesetzt werden können. Neben der absoluten Quantifizierung von einzelnen Biomolekülen ist es interessant, die Stöchiometrie und Stoffmengenverhältnisse zwischen RNA und Protein zu analysieren, um tiefgründigere Informationen über den viralen Aufbau und funktionale Zusammenhänge zu erhalten. Beispielsweise könnte eine massenspektrometrische Methode zur HIV-Proteinquantifizierung auch in der Impfstoffentwicklung einen Beitrag liefern, um die Protein-Zusammensetzung eines HIV-Impfstoffs quantitativ genau zu erfassen und darüber Rückschlüsse auf dessen Funktionsweise und Qualität ziehen zu können.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Humanes Immunschwächevirus (HIV)

#### 2.1.1. Krankheitsverlauf, Diagnostik & Therapie

Seit der Entdeckung des humanen Immunschwächevirus HIV (*human immunodeficiency virus*) im Jahre 1983 durch die Wissenschaftler Luc Montagnier, Françoise Barré-Sinoussi und Robert Gallo hat sich der Erreger pandemisch ausgebreitet<sup>1</sup>. Die Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) schätzte im Jahr 2016 weltweit 36,7 Millionen HIV-Infizierte, wovon 1,8 Millionen Neuinfektionen verzeichnet wurden<sup>43</sup>. Der Erreger wird durch den direkten Kontakt mit Wunden oder Schleimhäuten über Körperflüssigkeiten wie Blut, Sekrete und Muttermilch übertragen und verbleibt ein Leben lang im Organismus. Eine Heilung ist bis heute nicht möglich.

Die akute Phase beginnt kurz nach der HIV-Infektion, in der sich die Viren im Organismus sehr stark vermehren, indem sie CD4-Rezeptor-positive Zellen des Immunsystems (T-Zellen und Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems) infizieren und letztendlich zerstören<sup>44</sup>. Aufgrund der ersten Immunabwehr gegen das Pathogen sind in dieser Phase grippeähnliche Symptome charakteristisch, die nach kurzer Zeit wieder abklingen. Die chronische Phase oder auch klinische Latenz beginnt, die abhängig vom Gesundheitszustand des Patienten mehrere Monate bis Jahre andauern kann. HIV-Infizierte durchleben diese Phase oft ohne auffällige Beschwerden. Dennoch findet die HIV-Replikation ununterbrochen statt, weshalb auf Dauer das Immunsystem geschwächt wird. Die Virusmenge (Viruslast) im Blut übersteigt die Menge an Immunzellen und es entwickelt sich eine immer mehr ausgeprägte Immundefizienz. Zu den typischen Begleiterkrankungen gehören vor allem lebensbedrohliche opportunistische Infektionen wie z.B. Lungenentzündungen (*Pneumocystis carinii*), sowie maligne Tumore wie das selten auftretende Kaposi-Sarkom und Lymphome<sup>45,46</sup>. Dieses weit fortgeschrittene Krankheitsbild wird als erworbenes Immundefektsyndrom AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) definiert und kann abhängig vom Gesundheitszustand des Patienten nach 2 bis 15 Jahren ausbrechen<sup>43,47</sup>. Im Jahr 2016 starben weltweit eine Million Menschen an den Folgen einer HIV-Infektion<sup>43</sup>.

Für eine erste HIV-Diagnose werden zunächst die vom Immunsystem produzierten HIV-Antikörper und teilweise auch HIV-Antigene über einen sogenannten HIV-Suchtest (Immunoassay) nachgewiesen<sup>48</sup>. Ein wiederholt positives Ergebnis wird immer durch einen weiteren spezifischeren Test z.B. Westernblot bestätigt<sup>48</sup>. Da die Antikörper meist erst nach

sechs und spätestens nach zwölf Wochen nachweisbar sind, können frische Infektionen nur über einen HIV-PCR (*polymerase chain reaction*) -Test direkt nachgewiesen werden.

Wird eine HIV-Infektion frühzeitig erkannt und bei entsprechender Indikation mit einer antiretroviralen Therapie (ART) behandelt, kann die Krankheitsprogression zugunsten des Patienten verlangsamt werden. Für eine erfolgreiche Therapie müssen sogenannte hochaktive-antiretrovirale Medikamente (HAART, *highly active antiretroviral therapy*) kontinuierlich und ein Leben lang eingenommen werden<sup>48</sup>. Dafür werden mehrere verschiedene Präparate als Kombinationstherapie eingesetzt, die unterschiedliche Mechanismen im Replikationszyklus von HIV hemmen. Diese Präparate blockieren entweder den Viruseintritt in die Wirtszelle (Korezeptor-Antagonisten und Fusionsinhibitoren) oder wirken als Inhibitoren der viralen Enzym-Aktivität<sup>48</sup>. Dazu gehören nukleosidische oder nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI, NNRTI), Integrase- und Protease-Inhibitoren<sup>48</sup>. Ziel einer solchen Therapie ist es, einen Abfall der Viruslast bis unter die Nachweisgrenze zu erreichen, was zum Wiederanstieg der CD4-Zellzahl führt. Das Immunsystem kann sich erholen und wird kaum noch durch die HI-Viren geschädigt. Durch Verbesserungen in der Medikamenten-Entwicklung und in der medizinischen Versorgung stieg die Lebenserwartung HIV-infizierter Patienten in den USA und Europa. Laut einer Studie wird die Lebenserwartung bei erfolgreicher Therapie heutzutage statistisch nahezu wie die der Durchschnittsbevölkerung eingeschätzt<sup>49</sup>.

Zur Beurteilung der Krankheitsprogression oder einer antiretroviralen Therapie werden zusammen mit dem klinischen Krankheitsbild in regelmäßigen Zeitintervallen zwei wichtige Parameter quantitativ bestimmt: die CD4-Zellzahl in Zellen pro  $\text{mm}^3$  mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) und die HIV-Viruslast in RNA Kopien pro Milliliter Blut mittels quantitativer real-time PCR<sup>44</sup>. Da bekannt ist, dass in HIV infizierten Patienten eine ständige Virus-Replikation stattfindet, gilt die Viruslast als ein prognostischer Marker für die HIV-Erkrankung<sup>50,51</sup>. So konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass eine hohe Viruslast ( $> 100.000$  HIV RNA-Kopien/mL) sowie eine niedrige CD4-T-Zellzahl mit einer schnelleren Krankheitsprogression assoziiert ist<sup>44</sup>.

### 2.1.2. Genomstruktur und Morphologie von HIV-1

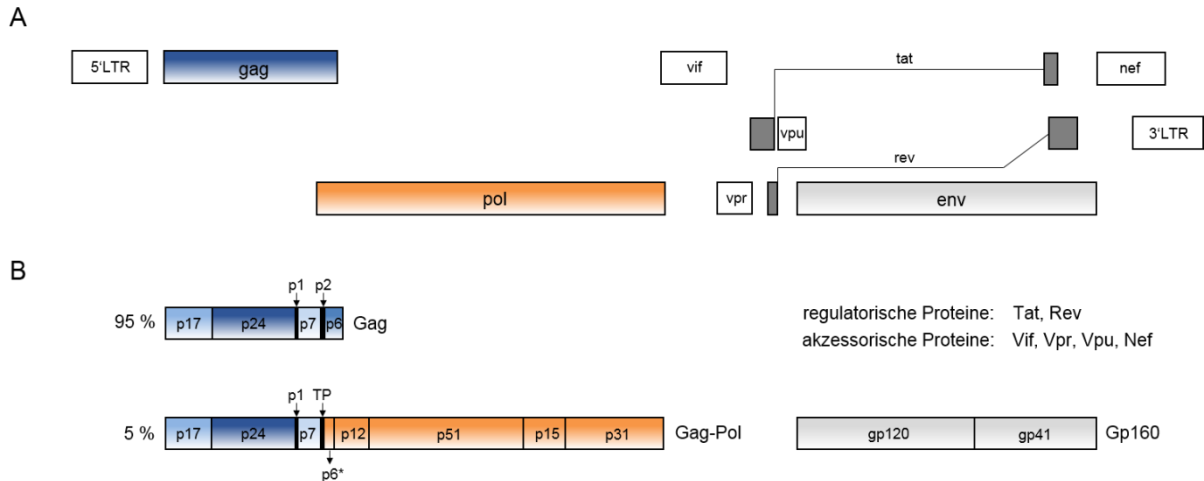
HIV wird der Familie der Retroviren und der Gattung der Lentiviren zugeordnet, da die genetische Information in zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen kodiert vorliegt<sup>52</sup>. Dieses RNA-Genom muss für die Virus-Vermehrung in den Wirtszellen revers in Protein-kodierende DNA umgeschrieben werden, um es im Wirtsgenom integrieren zu können<sup>52,53</sup>. Es wird mit einer Größe von ca. 10 kb an den Enden von LTR (*long terminal repeat*)-Elementen flankiert und enthält die typischen retroviralen Genombereiche *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*) nach dem Schema 5'-LTR-gag-pol-env-LTR-3' <sup>53,54</sup> (siehe Abbildung 2/A).

Der *gag*-Genombereich kodiert die viralen Strukturproteine, die zunächst als myristoyliertes 55 kDa Gag-Vorläufer-Polypeptid (GAGp55) synthetisiert werden. Von *N*- zu *C*-terminaler Richtung enthält GAGp55 die einzelnen Struktur-Proteinelemente: Matrix (MAp17), Capsid (CAp24), Spacer 1 (Sp1), Nukleocapsid (NCp7), Spacer 2 (Sp2) und p6<sup>55</sup> (siehe Abbildung 2/B). Diese einzelnen Proteinelemente werden durch proteolytische Spaltungen durch die virale Protease aus dem Vorläuferprotein prozessiert<sup>56</sup>.

Die viralen Enzyme sind im *pol*-Genombereich kodiert und werden auch als Teil eines großen 160 kDa Gag-Pol-Polypeptids synthetisiert. Dieses Vorläuferprotein entsteht durch eine ribosomale Leserasterverschiebung (*ribosomal frameshifting*) in der Sp2-kodierenden Region im *gag*-Genombereich<sup>57</sup>. Dies bedeutet, dass das zelluläre Ribosom an einer sogenannten Slippery-Sequenz um eine Nukleotidbase (-1) zurück in 5'-Richtung rutscht, wodurch die Translation auf der *pol* kodierenden Sequenz weitergeführt wird<sup>58</sup>. Das Gag-Pol-Polypeptid enthält die Gag-spezifischen Proteine (MAp17, CAp24, Sp1 und NCp7) und die Pol-spezifischen Proteineinheiten Transframepeptid, p6\* sowie die drei Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase<sup>59</sup> (siehe Abbildung 2/B). Gag-Pol wird im Verhältnis 1:20 (~ 5 %) im Vergleich zu Gag produziert<sup>57,60</sup>.

Die viralen Glykoprotein-Rezeptoren werden vom *env*- (*envelope*) Genombereich kodiert und bestehen aus einem transmembranen Proteinteil (Gp41) und einem externen Oberflächenprotein (Gp120), die aus dem Vorläufer-Polypeptid Gp160 prozessiert werden<sup>53,56</sup> (siehe Abbildung 2/B). Die Domänen werden als prozessierte und glykosylierte Trimere zur Zellmembran transportiert. Ein Virion enthält in etwa 10 trimere Glykoprotein-Rezeptoren<sup>61,62</sup>.

Weiterhin kodiert das HIV-Genom die regulatorischen Proteine Tat (*transactivator of transcription*) und Rev (*regulator of expression of virion proteins*), die essentiell für die Virus-Replikation sind<sup>53,56</sup>. Die akzessorischen Proteine sind dagegen für die Replikation nicht relevant, unterstützen aber z.B. die HIV-Freisetzung und -Übertragung<sup>53,56</sup>. Sie werden von den Genen *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr* (*viral protein r*), *vpu* (*viral protein u*) und *nef* (*negative regulatory factor*) kodiert.

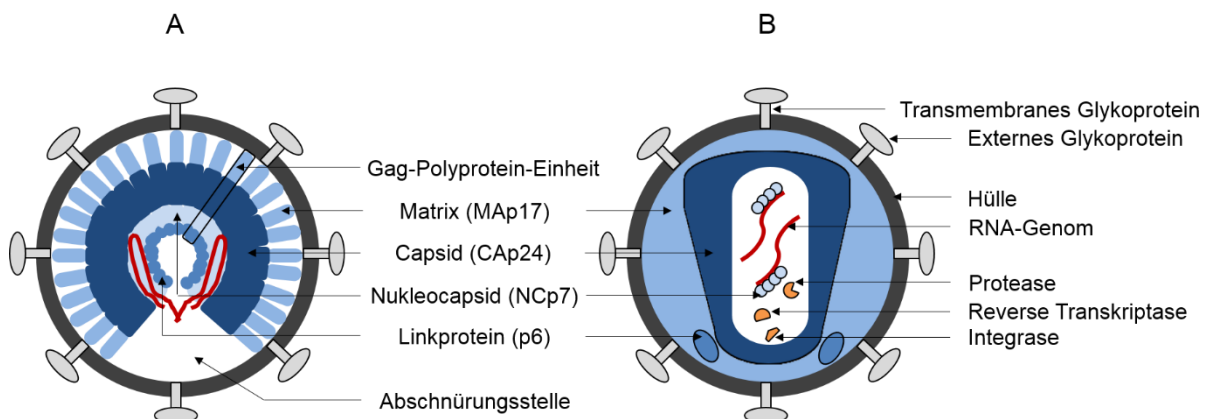


**Abbildung 2: Genomstruktur und Genprodukte von HIV-1.**

**A: Genomstruktur.** Das HIV-1 RNA-Genom ist am 5'- und 3'-Ende durch die LTR-Elemente (*long terminal repeat*) flankiert. Es kann in drei Leserahmen (ORF, open reading frame) translatiert werden. Blau: ORF *gag* (*group specific antigen*), Orange: ORF *pol* (*polymerase*), Hellgrau: ORF *env* (*envelope*), Weiß: ORF für die akessorischen Gene *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr* (*viral protein r*), *vpu* (*viral protein u*), *nef* (*negative regulatory factor*), Dunkelgrau: ORF für die regulatorischen Gene *tat* (*transactivator of transcription*) und *rev* (*regulator of expression of virion proteins*). Die Exons der *tat* (*tat1*, *tat2*)- und *rev* (*rev1*, *rev2*)-ORFs sind symbolisch jeweils miteinander verbunden.

**B: Genprodukte.** Gag-Polypolypeptid mit einzelnen Strukturproteineinheiten Matrix (MAp17), Capsid (CAp24), Spacer 1 (Sp1), Nukleocapsid (NCp7), Spacer 2 (Sp2) und p6. Gag-Pol-Polypeptid mit Gag-spezifischen Proteinen MAp17, CAp24, Sp1, NCp7 und pol-spezifischen Proteinen Transframe-Peptid (TP), p6\*, Protease (PRp12), Reverse Transkriptase mit RNaseH (RTp51-p15) und Integrase (INp31). Gp160-Polypeptid für Glykoprotein-Rezeptoren aus transmembraner Domäne Gp41 und externer Domäne Gp120.

Morphologisch ist HIV-1 ein sphärisch aufgebautes membranumhülltes Virus mit einem Partikel-Durchmesser von etwa 120 nm<sup>53,63</sup>. Die Morphologie reifer und unreifer Viren unterscheidet sich vor allem anhand der Strukturproteine (GAGp55) und ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. In unreifen Viruspartikeln ist ein Netz aus Gag-Polypeptiden charakteristisch (Abbildung 3/A).

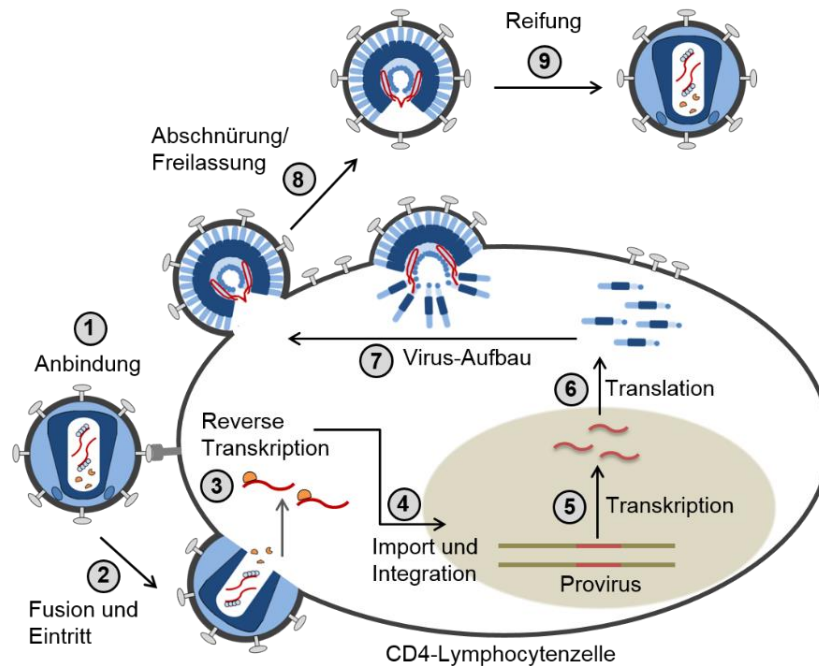


**Abbildung 3: Morphologie unreifer (A) und reifer (B) HIV-1-Partikel.**

GAGp55 ist das in der Stoffmenge dominierende Protein in einem Virion. Da GAGp55 als Vorläuferprotein in neu produzierte Viruspartikel verpackt wird, wird davon ausgegangen, dass die einzelnen Strukturproteineinheiten im Verhältnis 1:1 im Viruspartikel vorliegen<sup>60</sup>. Die Menge der eingebauten Gag-Polyprotein-Moleküle pro Virion ist dabei abhängig von der Virusgröße und vom Grad der Vollständigkeit der Gag-Hülle im Partikel<sup>64</sup>. Die Unvollständigkeit der Gag-Hülle wird vom Abschnürungsprozess neuer Viruspartikel von der Zellmembran verursacht<sup>64</sup>. Nach Carlson *et al.* enthalten neu-gebildete Viruspartikel ein gleichmäßiges Gag-Polyprotein-Netz mit einer Einbettung in die Membran von ca. zweidrittel des Viruspartikels<sup>64</sup>. Demnach enthält ein HIV-Partikel mit einer 61%igen Gag-Hülle und einem Durchmesser von 120 nm 1866 Gag-Moleküle und bei einem Durchmesser von 146 nm 2978 Gag-Moleküle<sup>64</sup>. Die Gag-enthaltenen Virionen sind unreif und nicht infektiös. Erst durch die enzymatische Prozessierung der Gag-Moleküle durch die virale Protease in die einzelnen funktionalen Strukturproteineinheiten kann sich die reife Partikelstruktur ausbilden (Abbildung 3/B). Charakteristisch für reife Viruspartikel ist das konisch-geformte Capsid, das symmetrisch von der Matrix umgeben ist. Das Capsid enthält zwei RNA-Moleküle, die mit den Nukleocapsidproteinen und mit den Enzymen einen Komplex bilden. Das Linkprotein p6 ist verantwortlich für die Abschnürung neu-produzierter Viruspartikel von der Zellmembran und stellt die Abschnürungsstelle im Partikel dar.

### 2.1.3. Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von HIV beschreibt eine zyklische Abfolge von Entwicklungsstufen für die Virusvermehrung und ist in Abbildung 4 vereinfacht dargestellt. Er soll in dieser Arbeit nur im Grundsatz beschrieben werden.



**Abbildung 4: Replikationszyklus von HIV.**

Der erste Schritt im HIV-Replikationszyklus ist die virale Erkennung von CD4-Rezeptor-positiven Immunzellen (Abbildung 4-1). CD4 ist der primäre Rezeptor für HIV, der vor allem durch die dritte und vierte konservierte Domäne (C3 und C4) des Glykoproteins Gp120 erkannt und gebunden wird<sup>65</sup>.

Die einfache CD4-Identifizierung reicht allerdings nicht für die HIV-Env-getriebene Membranfusion und Eintritt des Virions in die Zelle aus. Dafür wird ein weiterer Ko-Rezeptor benötigt, entweder der Ko-Rezeptor CXCR4 (Fusin) oder CCR5. Diese zwei Ko-Rezeptoren erklären den unterschiedlichen Zelltyp-Tropismus, da CXCR4 von T-Zelllinien exprimiert wird, CCR5 von Makrophagen und beide Ko-Rezeptoren von primären Lymphozyten<sup>56</sup>. Durch die Bindung von Gp120 an CD4 ändert sich die Konformation von Gp120 und die Bindungsaffinität zum Ko-Rezeptor steigt. Dies führt letztendlich zu konformationellen Veränderungen in der viralen transmembranen Domäne Gp41, wodurch die Membran-Fusion zwischen HIV und Zelle ausgelöst wird<sup>66–68</sup> (Abbildung 4-2). Mit der Fusion viraler und zellulärer Membran tritt das virale Core in das Cytoplasma der Zelle ein und wandelt sich zunächst zu einem Komplex um,



der als *reverse transcription complex* (RTC) bezeichnet wird<sup>56</sup>. Dieser Komplex besteht aus MAP17, NCp7, die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase und das akzessorische Protein Vpr.

Eine definierende Eigenschaft für Retroviren ist ihre Fähigkeit ihr RNA-Genom mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umzuwandeln<sup>56,69</sup> (Abbildung 4-3). Das Enzym ist ein Heterodimer aus zwei Einheiten: die RT-aktive Domäne p51 und die RNaseH-Domäne p15. Die Reverse Transkription wird durch eine zelluläre tRNA initiiert, die als Primer fungiert und in der *primer binding site* (pbs) bindet. Die DNA-Synthese folgt dem 5'-Ende des RNA-Strangs und generiert einen DNA-RNA-Hybriden. Der RNA-Strang wird durch die RNaseH-Aktivität des RT-Enzyms abgebaut.

Der Komplex, der als *preintegration complex* (PIC) bezeichnet wird, ist verantwortlich für den Import des viralen Genoms (DNA) und der viralen Integrase in den Zellkern<sup>56</sup> (Abbildung 4-4). Im Zellkern katalysiert die Integrase die Insertion der linearen doppelsträngigen viralen DNA in das Wirtsgenom<sup>70,71</sup>. Die integrierte DNA wird auch als Provirus bezeichnet und dient als Template für die Synthese der viralen RNA, die alle Virus-Komponenten kodiert, die für die Virus-Replikation benötigt werden.

Die Transkription des Provirus erfolgt in der 5'-LTR-Region. Die transkriptionelle Aktivität wird vor allem durch das regulatorische virale Protein Tat gesteigert<sup>72,73</sup> (Abbildung 4-5). Während der Transkription werden mehr als 30 RNA-Moleküle generiert, die in drei Klassen unterteilt werden<sup>74,75</sup>: die nicht-gesplicte RNA, die als mRNA für die Gag und Gag-Pol Vorläuferproteine fungiert und in neu-gebildete Virionen als genomische RNA verpackt wird; die partiell gesplicte mRNA, die Env, Vif, Vpu und Vpr kodiert und kleinere mehrfach gesplicte mRNAs, die zu Rev, Tat und Nef translatiert werden.

Das regulatorische Protein Rev ist verantwortlich für den Export der ungesplicten und partiell gesplicten viralen mRNA vom Nukleus in das Cytoplasma<sup>76</sup>. Dazu bindet Rev die virale RNA am *Rev responsive element* (RRE), das im *env*-Genombereich liegt und bildet mit der zellulären Kern-Export-Maschinerie einen Komplex<sup>56</sup>. Im Cytoplasma folgt anschließend die Synthese aller viralen Proteine (Abbildung 4-6).

Anschließend folgt der Prozess des Aufbaus aller viralen Komponenten zu Viruspartikeln, der vor allem vom Gag-Vorläuferprotein gesteuert wird, da gezeigt werden konnte, dass die Gag-Expression allein ausreicht, um nicht-infektiöse Viruspartikel (*virus-like particles*) zu bilden<sup>57,77</sup>. Der Aufbau der neuen Viruspartikel erfolgt an der Zellmembran der infizierten Zelle (Abbildung 4-7). Die Einbettung der Gag- und Gag-Pol-Polypoteine in die Zellmembran wird durch die Matrix-Domäne (MAP17) des Gag-Polypotein gesteuert und wird durch die Interaktion des myristoylierten N-Terminus sowie einer Abfolge von positiv geladenen Resten (Arginine und Lysine) mit negativ geladenen Membran-Phospholipiden realisiert<sup>78,79</sup>. Die nachfolgende

Capsid-Domäne (CAp24) des Gag-Polypeptids ist das Hauptstrukturelement und ist bedeutend für die Gag-Gag-Interaktionen, um das typische Gag-Polypeptidnetz in unreifen Viruspartikeln auszubilden<sup>55,80</sup>. Anschließend folgt die Nukleocapsid-Domäne (NCp7) des Gag-Polypeptids, die das virale Genom am  $\psi$ -Element erkennt und es so in die Viruspartikel verpackt<sup>81–83</sup>. Vor allem der sehr hohe Anteil an basischen Resten und die zwei charakteristischen Zinkfinger-Motive des Typs „CCHC“ sind verantwortlich für die Bindung und Kondensierung des viralen Genoms.

Das virale Env-Glykoprotein wird als Vorläuferprotein Gp160 im rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, cotranslational glykosyliert, gefaltet und zu Trimeren zusammengebaut<sup>84</sup>. Während des Transports von Gp160 über den Golgi-Apparat zur Zellmembran wird es durch eine zelluläre Protease (Furin) zum reifen Oberflächen-Glykoprotein Gp120 und transmembranen Glykoprotein Gp41 prozessiert<sup>84</sup>. Gp41 verankert den Env-Komplex in die Membran und ist mit Gp120 nicht-kovalent verknüpft.

Anschließend folgt die Abschnürung und Freilassung von neu-aufgebauten Viruspartikeln aus der infizierten Zelle (Abbildung 4-8). Dieser Abschnürungsprozess wird wiederum vom Gag-Polypeptid gesteuert. Dafür verantwortlich ist die p6-Domäne von Gag, die zwei sogenannte „late domain“ Motive (L-Domäne) enthält, die zelluläre Proteine des ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Komplexes rekrutieren und eine Abschnürung und Freilassung der Viruspartikel von der Zelle bewirken<sup>85–87</sup>. Zu den beiden L-Domänen gehören das PTAP-Motiv, das die ESCRT-I-Komponente TSG101 bindet, und die LYP<sub>x</sub>L-Domäne, die das ESCRT-assoziierte Protein Alix rekrutiert<sup>88–90</sup>. Nach der Abschnürung der Viruspartikel von den Wirtszellen befinden sie sich in einem unreifen nicht-infektiösen Zustand<sup>57,78</sup>.

Deshalb ist der letzte Schritt – „die Reifung“ – im HIV-Replikationszyklus von neu-synthetisierten Virus-Partikel essentiell (Abbildung 4-9). Dieser Prozess wird von der viralen Protease gesteuert, die die Vorläuferproteine Gag und Gag-Pol in die reifen einzelnen Strukturproteine aus Gag und die viralen Enzyme aus Pol prozessiert<sup>57,78</sup>. Die Protease wird über einen autokatalytischen Prozess aus Pol aktiviert<sup>91</sup>. Mit der enzymatischen Prozessierung der Vorläuferproteine kann die reife infektiöse Partikelstruktur ausgebildet werden wie z.B. die charakteristische CAp24-Core-Struktur (siehe Abbildung 3, Seite 8).

#### 2.1.4. Genetische Diversität und Klassifizierung von HIV-1

Aufgrund der sehr schnellen HIV-Produktion von ca. 10 Milliarden neuer Viruspartikel pro Tag und der sehr hohen Mutationsrate von HIV entsteht ein breites Spektrum an genetisch unterschiedlichen Virusvarianten innerhalb eines Individuums<sup>92,93</sup>. Deshalb wird HIV auch als Quasispezies bezeichnet. Bei nicht therapierten Patienten kann eine Viruslast höher als  $10^7$  Viren pro Milliliter Blut erreicht werden<sup>92</sup>. Eine einzelne HIV-infizierte Zelle kann etwa  $5 \times 10^4$  Virionen an einem Tag produzieren<sup>94</sup>.

Die genetische Diversität des HIV-Genoms wird durch die hohe Replikationsrate und fehleranfälligen Reverse Transkriptase verursacht<sup>95</sup>. Eine Eigenschaft der Reversen Transkriptase ist die geringe Bindungsaffinität zum RNA-Strang, weshalb eine intramolekulare Verschiebung des Enzyms auf einem RNA-Strang möglich ist, wodurch häufig Basensubstitutionen sowie Insertionen und Deletionen (*indels*) in Genomabschnitte eingeführt werden<sup>96,97</sup>. Aber auch der intermolekulare Wechsel des Enzyms zwischen zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen ist möglich<sup>97</sup>. Handelt es sich dabei um unterschiedliche RNA-Genotypen, können durch den Wechsel des RNA-Strangs während der Reversen Transkription neue rekombinante Virusvarianten entstehen, die komplex aus mehreren Subtypanteilen aufgebaut sein können<sup>98</sup>.

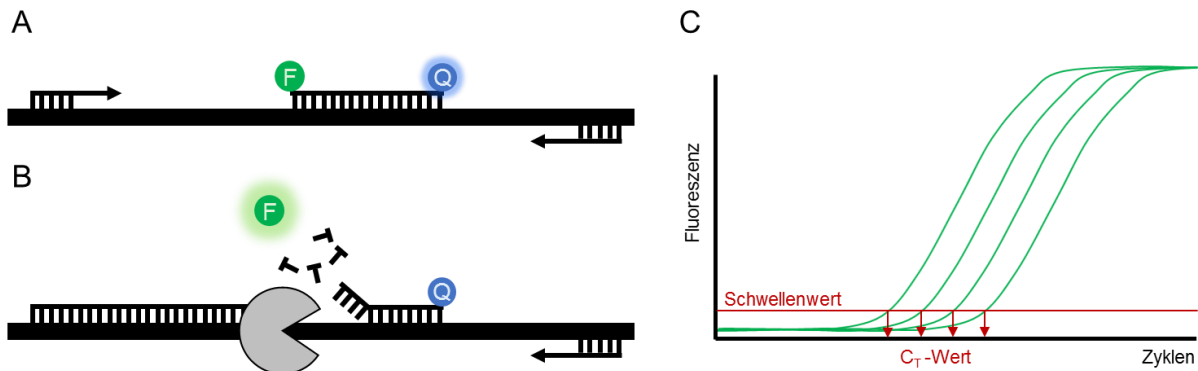
Der Grad der Sequenzvarianz ist abhängig von der Genomregion. Sehr konservierte Genombereiche sind Bereiche der LTR-Region, die aktiven Zentren der Reversen Transkriptase und Integrase sowie das CAp24-Protein<sup>99,100</sup>. Hypervariable Genabschnitte enthält dagegen der *env*-Genombereich, der die viralen Glykorezeptoren kodiert<sup>100</sup>. Die Aminosäuresequenzen von *env* können innerhalb eines HIV-Subtyps um 17 % und im *gag* um 8 % voneinander abweichen<sup>101</sup>. Zwischen verschiedenen Subtypen kann die Abweichung im *env*-Genombereich 20-36 %, im *gag*-Genombereich 15-22 % und in *pol* 9-11 % betragen<sup>101,102</sup>.

Aufgrund der stark ausgeprägten genetischen Variabilität von HIV-1, wird es basierend auf phylogenetische Analysen in die vier genetischen Gruppen M, N, O und P eingeteilt<sup>103</sup>. Die HIV-1 Hauptgruppe M (major) ist die pandemisch relevante Gruppe, da 95 % der weltweiten HIV-Infektionen dieser zuzuordnen sind<sup>98</sup>. Die HIV-1 Gruppe M wird in neun verschiedene Subtypen (A-D, F-H, J, K) unterteilt<sup>103,104</sup>. Nach derzeitigen Stand dominiert in der weltweiten HIV-1 Epidemie mit 55,6 % Subtyp B<sup>105</sup>.

## 2.2. Nukleinsäure-Quantifizierung mittels PCR

### 2.2.1. Quantitative real-time PCR

In der klinischen Praxis zählt die quantitative real-time PCR zu den Standardverfahren für die Quantifizierung von Erregern wie Bakterien, Pilzen und Viren<sup>6-8</sup>. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, wobei in Echtzeit die Quantifizierung der amplifizierten DNA-Moleküle ermöglicht wird. Dieser Amplifikationsprozess von Nukleinsäuren bringt dabei den großen Vorteil, dass kleinste Mengen von DNA-Molekülen nachgewiesen werden können. Für die Analyse wird in Echtzeit die Amplifikationsreaktion der DNA über Fluoreszenzmessung aufgenommen. Dafür gibt es verschiedene chemische Anwendungsprinzipien von Fluorophoren, die entweder für die DNA-sequenz-spezifische oder -unspezifische Detektion eingesetzt werden. Die sequenz-unspezifische Detektion beruht dabei auf DNA bindenden Farbstoffen wie z.B. SybrGreen, einer DNA interkalierenden Substanz<sup>106</sup>. In der klinischen Diagnostik werden jedoch grundsätzlich sequenz-spezifische Detektionstechniken verwendet, um z.B. den Erreger spezifisch nachzuweisen und Fehler in der Quantifizierung zu vermeiden. Die meisten klinischen Tests basieren auf der Taq Man-Chemie als sequenz-spezifische Detektionsmethode. Ein Taq Man Assay ist so aufgebaut, dass zwischen den zwei sequenz-spezifischen Primern (*sense* und *antisense*) zusätzlich eine zweifach-markierte sequenzspezifische Sonde bindet, die am 5'-Ende einen Fluorophor und am 3'-Ende ein Quencher-Molekül besitzt<sup>5</sup> (Abbildung 5, A). In diesem Zustand löscht das Quencher-Molekül die bei Anregung vom Fluorophor emittierte Fluoreszenz durch den Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)<sup>5</sup>. Während der Amplifikation des Zielgens wird die Sonde jedoch durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zerstört, wodurch sich der Abstand zwischen Fluorophor und Quencher so weit vergrößert, dass das Prinzip von FRET und damit der Effekt der Fluoreszenzlöschung aufgehoben wird<sup>107</sup> (Abbildung 5, B). Die von den Fluorophoren emittierte Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus in Echtzeit gemessen und nimmt direkt proportional zur amplifizierten DNA-Menge zu. Es werden typische Amplifikationskurven aufgezeichnet, die abhängig von der DNA-Start-Kopienzahl nach einigen PCR-Zyklen ansteigen und in die exponentielle Phase übergehen (Abbildung 5, C). Da die PCR-Chemikalien nach einer gewissen Zeit verbraucht sind, nimmt die PCR-Reaktion ab und die Amplifikationskurve endet in einem Plateau. Deshalb wird die Quantifizierung direkt zu Beginn der exponentiellen Phase vorgenommen, wo die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundsignale übersteigt, da hier optimale Reaktionsbedingungen vorliegen<sup>108</sup>. Für die Quantifizierung wird in diesem Bereich für jede Messung der so genannte Schwellenwert-Zyklus ( $C_T$ -Wert, *cycle threshold*) ermittelt<sup>108</sup>. Am Ende kann die DNA-Konzentration unbekannter Proben relativ über gleichzeitig gemessene Standards bekannter Konzentration und deren gemessener  $C_T$ -Werte bestimmt werden.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Taq Man-Assays und qPCR**

**A:** Sequenzspezifische Primer (sense und antisense) binden auf der Zielsequenz. Die sequenzspezifische Sonde bindet zwischen dem Primerpaar und ist mit einem Fluorophor (F) und einem Quencher-Molekül (Q) markiert.  
**B:** Während der PCR-Reaktion zerstört die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die Sonde. Fluorophor und Quencher lösen ihren Abstand zueinander, wodurch der Fluorophor emittiert.  
**C:** Die während der Amplifikation entstehenden Fluoreszenzsignale werden in Echtzeit aufgenommen und die typischen Amplifikationskurven aufgezeichnet. Für die Quantifizierung mithilfe von mitgeführten externen Standards wird ein Schwellenwert festgelegt und die daraus resultierenden  $C_T$ -Werte (*cycle threshold*) für die Quantifizierung eingesetzt.

### 2.2.2. Digitale PCR

Die digitale PCR (dPCR) ist eine technologische Weiterentwicklung im Bereich der quantitativen PCR und ist im Gegensatz zur vorher beschriebenen qPCR eine absolute Quantifizierungsmethode, da die Quantifizierung direkt, also ohne Verwendung einer Kalibrierungskurve bzw. externer Standards, erfolgen kann. Historisch wurde diese PCR-Technologie als „*single molecule PCR*“ bezeichnet<sup>109</sup>. Dieser Begriff beschreibt das Prinzip des Verfahrens – die Separierung von einzelnen DNA-Molekülen in viele kleine abgeschlossene Reaktions-einheiten am ehesten. Die erste quantitative Anwendung der Technologie wurde im Jahr 1990 für die HIV-Quantifizierung veröffentlicht<sup>109,110</sup>. Der heute verwendete Begriff digitale PCR wurde erst später 1999 von Kinzler und Vogelstein eingeführt<sup>111</sup>.

Die Aufteilung der einzelnen DNA-Moleküle in viele kleine Reaktionseinheiten (*partitions*) kann entweder in Kapillaren, Mikro-Tröpfchen (*Droplets*), Arrays oder Nukleinsäure-bindende Oberflächen erfolgen<sup>5</sup>. In dieser Arbeit wurde ein System zur Einteilung der DNA-Moleküle in Mikro-Tröpfchen mit Hilfe der Mikrofluidik und Wasser-zu-Öl Emulsionstechnologie genutzt und wird entsprechend als *droplet digital PCR* (ddPCR) bezeichnet<sup>112</sup>. Die eingesetzte PCR-Chemie ist ähnlich aufgebaut wie bei der klassischen qPCR, d.h. es können entweder spezifische Taq Man-Sonden (Abbildung 5, A + B) oder interkalierende Farbstoffe für die Fluoreszenzdetektion verwendet werden. Die Verteilung der DNA-Moleküle in mehrere 1000 Reaktionseinheiten ist zufällig und entspricht einer Poisson-Verteilung. Anschließend erfolgt die PCR-Reaktion wie für die qPCR, dargestellt in Abbildung 5 (C). Im Gegensatz zur qPCR, wo die exponentielle Phase für die Quantifizierung genutzt wird, ist die ddPCR eine Endpunkt-Methode, d.h. die

einzelnen Tröpfchen werden erst am Ende der PCR-Reaktion (Plateau-Phase) nach Fluoreszenz-positiv und -negativ bewertet<sup>112</sup>. Abhängig von der Konzentration der zu analysierenden Probe können Tröpfchen entweder kein, ein oder mehrere DNA-Moleküle enthalten. Deshalb erfolgt die Berechnung der durchschnittlichen DNA-Kopienzahl pro positiver Einheit ( $\lambda$ ) durch eine Poisson-Korrektur<sup>112</sup>:

$$\lambda = -\ln\left(1 - \frac{N_{\text{pos}}}{N}\right)$$

$\lambda$ :	durchschnittliche Anzahl der Ziel-DNA-Moleküle pro Einheit
$N_{\text{pos}}$ :	Anzahl positiver Tröpfchen
$N$ :	Gesamtanzahl der Tröpfchen

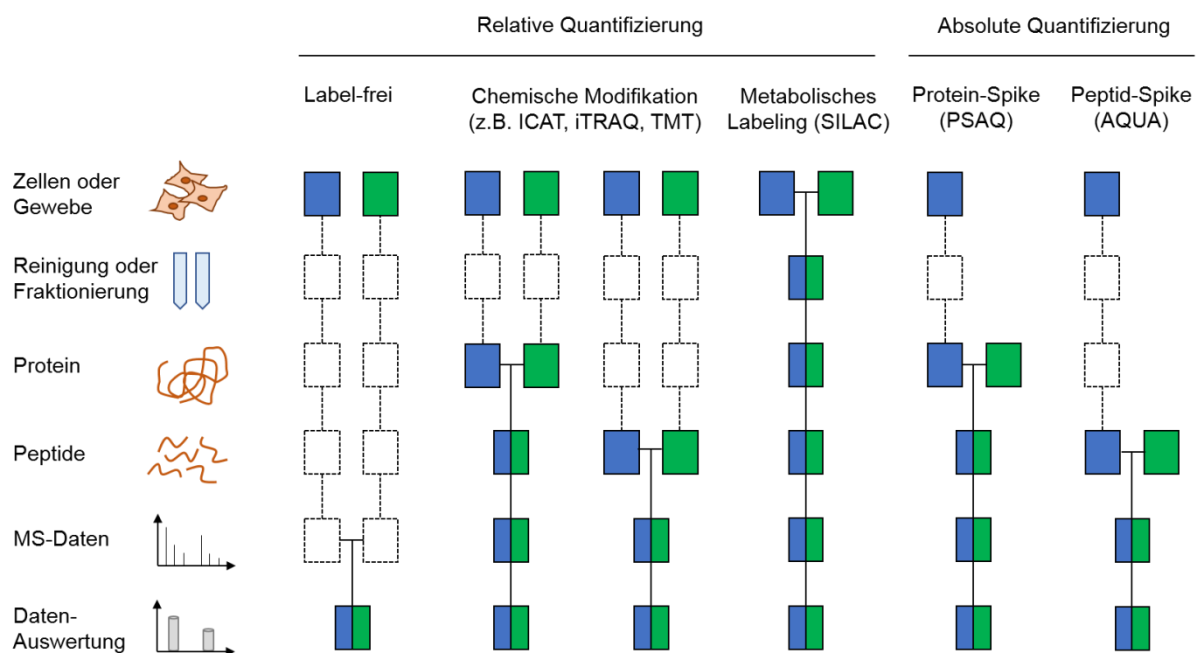
## 2.3. Massenspektrometrie basierte Proteomics

Proteine stellen die funktionalen Einheiten in allen zellulären Prozessen und Regulationsmechanismen dar. Dabei spielen Veränderungen in der Protein-Konzentration, biologische Modifikationen, Proteinstruktur und Protein-Protein-Interaktionen eine wesentliche Rolle. Der Begriff, das Proteom, wurde erstmals 1996 definiert und beschreibt alle Proteine und deren Modifikationen, die von einer Zelle oder einem bestimmten Gewebetypen zu einer bestimmten Zeit exprimiert werden<sup>113</sup>. Charakteristisch für das Proteom ist die hohe Komplexität und Dynamik aufgrund von möglichen Protein-Splicing-Formen bzw. Isoformen und verschiedenen post-translationalen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen oder Glykosylierungsmustern, wodurch die vollständige Analyse des Proteoms eine Herausforderung darstellt<sup>114</sup>. Vor allem die Massenspektrometrie hat sich durch die fortschrittliche Entwicklung als ein zentrales analytisches Messverfahren für Proteomics-Studien bewährt<sup>115</sup>. Für viele Fragestellungen war vor allem die Weiterentwicklung der Methodik von der rein qualitativen Analyse des Proteoms zur quantitativen Analyse bedeutend<sup>116</sup>. Die verbreiteten Quantifizierungsstrategien für Proteine mithilfe der Massenspektrometrie werden im nächsten Abschnitt näher erläutert.

### 2.3.1. Protein-Quantifizierungsstrategien

Allgemein ist Voraussetzung für jede Art der massenspektrometrischen Proteinquantifizierung, dass nach der Probenentnahme und -präparation, die intakten Proteine einer Probe enzymatisch in kleine spezifische Peptidbruchstücke gespalten werden (*bottom-up*-Analyse). Das am häufigsten für die Proteolyse eingesetzte Enzym ist Trypsin, da es sehr spezifisch C-terminal von Lysin (K)- und Arginin (R)- Resten schneidet. Der Vorteil besteht darin, dass die meisten tryptischen Peptide mindestens zwei protonierbare Stellen enthalten: die *N*- $\alpha$ -Aminogruppe und der C-terminale basische Aminosäurerest von K oder R. Dadurch werden zweifach positiv geladene  $[M+2H]^{2+}$  Ionen begünstigt, die in der Gasphase effizienter fragmentiert werden können<sup>117</sup>. Diese tryptischen Peptide sind so genannte Fingerprints für ein spezifisches Protein und werden stellvertretend für das zu quantifizierende intakte Protein betrachtet.

Man unterscheidet im Bereich der massenspektrometrischen Proteinquantifizierung zwischen relativer und absoluter Quantifizierung. Abbildung 6 zeigt einen Überblick über die am häufigsten verwendeten Protein-Quantifizierungsstrategien in der organischen Massenspektrometrie und gibt einen Eindruck von den experimentellen Variationen und Fehlerquellen auf den verschiedenen Ebenen der Probenvorbereitung.



**Abbildung 6: Arten der quantitativen Massenspektrometrie in der Proteinanalytik.**

Die grüne Box ist die Referenz (isotopenmarkierte Probe) zur blauen Box (natürliche Probe). Die horizontale Verbindung der Boxen bedeutet die Kombination der beiden Zustände. Bereiche für experimentelle Variationen und Fehlerquellen für die Quantifizierung sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. (Abbildung angelehnt an <sup>114</sup>).

Im Bereich der Forschung wird häufig die relative Protein-Quantifizierung genutzt, um die Veränderung des Proteinprofils zwischen zwei oder mehreren verschiedenen experimentellen Zuständen z.B. zwischen behandelt und unbehandelt zu untersuchen. Die einfachste Art dieser relativen Quantifizierung ist die Label-freie Quantifizierung. Wie in Abbildung 6 dargestellt, werden für diesen Ansatz Proben mit zwei verschiedenen Zuständen separat bearbeitet und gemessen und erst am Ende bei der Datenauswertung erfolgt der direkte Vergleich der massenspektrometrischen Signalintensitäten von Peptiden<sup>114</sup>. Da in diesem Fall der Grad der experimentellen Variation während der Probenvorbereitung und -analyse sehr hoch ist, wurden verschiedene Strategien der Markierung von Peptiden und Proteinen mittels stabiler Isotope konzipiert. Da die natürlichen Analyten aus der Probe und die isotope-markierten Analoga das gleiche chemische Verhalten aufzeigen z.B. während der chromatographischen Trennung und der massenspektrometrischen Analyse, wird ab dem Zeitpunkt der Verwendung der isotope-markierten Analoga eine interne Standardisierung realisiert. Dies führt zu einer Reduktion von experimentellen Variationen und damit zu einer besseren Reproduzierbarkeit von Messergebnissen. Für die relative Proteinquantifizierung gibt es vor allem chemische und metabolische Verfahren der Isotopen-Markierung von Aminosäuren (siehe Abbildung 6). Die Prinzipien sollen hier nur kurz erwähnt werden. Für die chemische Isotopen-Markierung wurden diverse isotope-markierte Tags entwickelt, die an reaktive Aminosäuregruppen, primär an Lysin- und Cysteinreste gekoppelt werden können. Zu den bekannten Cystein-Markierungen zählt der isotope-markierte Tag ICAT (*isotope-coded affinity tag*), der aufgrund der zusätzlichen Biotin-Gruppe gleichzeitig eine Reinigung von Cystein-derivatisierten Peptiden ermöglicht<sup>118</sup>. Andere Isotopen-Marker wie iTRAQ (*isotope tags for relative and absolute quantification*) und TMT (*tandem mass tags*) modifizieren die Aminogruppen des N-Terminus und von Lysin-Resten<sup>119,120</sup>. Wie in Abbildung 6 dargestellt, können diese verschiedenen isotope-markierten Tags entweder auf Proteinebene oder auf Peptid-ebene angewendet werden. Im Gegensatz zur chemischen Isotopen-Markierung bieten metabolische Markierungsverfahren den Vorteil, dass unterschiedlich behandelte Proben direkt zu Beginn auf der Ebene intakter Zellen oder Organismen kombiniert werden können und damit alle Fehlerquellen während der Probenvorbereitung und -analyse kompensiert werden<sup>114</sup> (siehe Abbildung 6). Die metabolische Markierung z.B. einer Zellkultur findet während des Zellwachstums und der Zellteilung statt. Mann *et al.*<sup>121</sup> führten 2002 die SILAC-Anwendung (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) ein, bei der eine Zellkultur in natürlichem Kulturmedium kultiviert wird und eine zweite Zellkultur in einem Kulturmedium, das isotope-markiertes Arginin und Lysin enthält. Um den Einfluss z.B. eines Wirkstoffs auf das Proteom zu analysieren, wird die natürliche Zellkultur ohne und die isotope-markierte Zellkultur mit Wirkstoff behandelt. Beide Zellkulturen können anschließend kombiniert werden, um

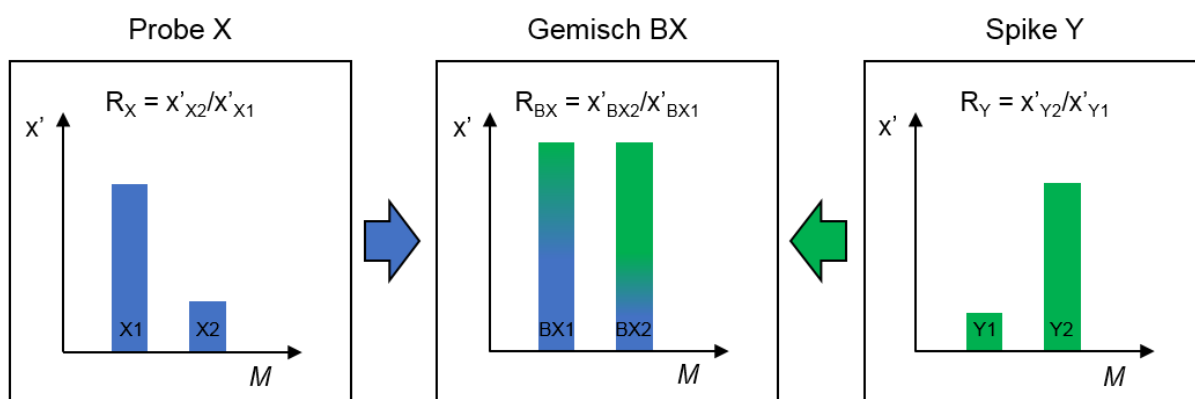


Unterschiede im Proteinprofil zwischen natürlichen und markierten Peptiden relativ erfassen zu können.

Für viele Fragestellungen in der Forschung aber auch im Bereich der klinischen Chemie ist vor allem die absolute Proteinquantifizierung wie zum Beispiel die Bestimmung der Stoffmengenkonzentration eines Biomarkers im Serum von Bedeutung, um den Gesundheitszustand eines Patienten bewerten zu können<sup>116</sup>. Wie in Abbildung 6 dargestellt, werden dafür dem Probenmaterial isotoopenmarkierte Spikematerialien entweder auf Protein- oder Peptidebene hinzugefügt. Dabei wird zwischen drei Arten von stabilen isotoopenmarkierten Spikematerialien unterschieden: AQUA<sup>122–125</sup>, QconCAT<sup>126–128</sup> und PSAQ<sup>129–131</sup>. AQUA steht für „*absolute quantification of proteins via peptide standards*“ und nutzt ausgewählte tryptische Signaturpeptide, bei denen meist eine Aminosäure vollständig <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markiert vorliegt. Diese Peptide werden chemisch synthetisiert. Vor allem für die Quantifizierung post-translationaler Modifikationen eignen sich AQUA-Standards besonders, da post-translationale Modifikationen leicht artifiziell einzubauen sind<sup>123,125</sup>. Für Multiplex-Studien ist die Verwendung einzelner AQUA-Peptide sehr aufwendig, weshalb von Beynon *et al.* die QconCAT-Methodik entwickelt wurde<sup>126</sup>. QconCAT steht für „*quantification concatemer*“, wobei ein Concatemer eine Verkettung von mehreren quantifizierbaren Peptiden in einer künstlichen Proteinsequenz bedeutet. Diese designte künstliche Concatemer-Sequenz wird rekombinant in *E. coli* exprimiert und gleichzeitig metabolisch markiert, z.B. indem die Bakterien zuvor in <sup>15</sup>N-angereichertem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Während der Proteolyse der Protein-Analyten entstehen parallel aus dem künstlichen Concatemer die stabilen isotoopenmarkierten Peptide. Die dritte Möglichkeit für isotoopenmarkierte Standards ist der Einsatz von <sup>15</sup>N-markierten rekombinanten Proteinen (PSAQ: „*protein standards for absolute quantification*“). Brun *et al.* konnten zeigen, dass PSAQ eine genauere Quantifizierung ermöglicht als die AQUA- und QconCAT-Strategie, da das markierte rekombinante Protein frühzeitig zum analytischen Prozess der Probe zugesetzt werden kann und Protein-Analyt und -Standard die gleichen chemischen Eigenschaften aufweisen<sup>129</sup>. Dadurch werden bereits Fehlerquellen in der Proteolyse ausgeglichen. Die Massenspektrometrie-basierte absolute Proteinquantifizierung hat sich als ein sehr genaues und rückgeführtes Messverfahren bewährt, welches auch als Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie bezeichnet wird. Das genaue Prinzip der Isotopenverdünnung wird im nächsten Abschnitt näher erläutert.

### 2.3.2. Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie

Nach der Definition des CCQM ist die IDMS ein anerkanntes Primärverfahren zur Bestimmung der chemischen Stoffmenge<sup>11</sup>. Wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben, erfolgt die Quantifizierung eines Analyten durch Zugabe eines isotonenmarkierten Analogons (Spike). In der anorganischen Elementanalytik wird meist isotonenangereichertes Spike-Material verwendet. Dagegen werden in der organischen Analytik die Spike-Materialien meist <sup>13</sup>C- und/oder <sup>15</sup>N-markiert. Das Prinzip der IDMS ist in Abbildung 7 dargestellt. Voraussetzung für eine exakte Quantifizierung mittels IDMS ist, dass die Isotonenanteile des Analyten  $R_X$ , des Spikes  $R_Y$  und die Veränderung der Isotonenanteile  $R_{BX}$  durch das Durchmischen des Analyten aus der Probe und des Spikes bestimmt werden. Zudem muss die Probe homogen vorliegen.



**Abbildung 7: Prinzip der IDMS.**

Isotonenverhältnis des zu analysierenden Elementes in der Probe  $R_X$ , der Spike-Lösung  $R_Y$  und in der Probenmischung  $R_{BX}$  (Probe + Spike).  $x'$  beschreibt den Isotonenanteil eines Elementes.

Die Bestimmung der verschiedenen Isotonenverhältnisse  $R_X$ ,  $R_Y$  und  $R_{BX}$  ist vor allem dann relevant, sobald sich die Isotopologen des Analyten aus der Probe mit denen des Spikes überlagern. Dies trifft vor allem für die anorganische Elementanalytik und für kleinere organische Moleküle zu. Ist der verwendete Spike hinsichtlich der Konzentration, Reinheit und des Isotonenverhältnisses ausreichend charakterisiert, kann das Prinzip der einfachen oder *single* IDMS angewendet werden. Die Stoffmengenkonzentration des Analyten in der Probe wird dann auf die Konzentration des eingesetzten Spikes rückgeführt. Sie kann unter Berücksichtigung weiterer Eingangsgrößen nach der Gleichung der einfachen Isotonenverdünnung wie folgt berechnet werden:

$$c_X = c_Y \cdot \frac{m_Y}{m_X} \cdot \frac{R_Y - R_{BX}}{R_{BX} - R_X}$$

- $c_X$ : Konzentration des Analyten in der Probe X (mol/L)  
 $c_Y$ : Konzentration des Spikes Y (mol/L)  
 $m_X$ : Masse der Probe X in Probenmischung BX (g)  
 $m_Y$ : Masse des Spikes Y in Probenmischung BX (g)  
 $R_X$ : Isotopenverhältnis von Probe X als  $x_{X2}/x_{X1}$   
 $R_Y$ : Isotopenverhältnis des Spikes Y als  $x_{Y2}/x_{Y1}$   
 $R_{BX}$ : Isotopenverhältnis der Probenmischung BX als  $x_{BX2}/x_{BX1}$

Da die Eigenschaften der Spike-Materialien oftmals nicht bekannt sind, wurde die doppelte IDMS etabliert, bei der die Probenmischung BX gegen eine weitere Kalibriermischung BC kalibriert wird. Die Kalibriermischung dient dazu, das unbekannte Spike-Material gegen ein isotopisch natürliches Referenzmaterial, das hinsichtlich der Konzentration, Reinheit und Isotopenzusammensetzung sehr gut charakterisiert ist, zu kalibrieren. Demnach erweitert sich die Gleichung unter Einbeziehung der Kalibriermischung folgendermaßen:

$$c_X = c_Z \cdot \frac{m_Y}{m_X} \cdot \frac{m_{ZC}}{m_{YC}} \cdot \frac{R_Z - R_{BC}}{R_{BC} - R_Y} \cdot \frac{R_Y - R_{BX}}{R_{BX} - R_X}$$

- $c_Z$ : Konzentration des Analyten im Referenzmaterial Z (mol/L)  
 $m_{ZC}$ : Masse des Referenzmaterials Z in Kalibriermischung BC (g)  
 $m_{YC}$ : Masse des Spikes Y in Kalibriermischung BC (g)  
 $R_Z$ : Isotopenverhältnis des Referenzmaterials Z  
 $R_{BC}$ : Isotopenverhältnis der Kalibriermischung BC

Da für die meisten Analyten keine Variation in der Isotopenzusammensetzung beobachtet wurde, gilt  $R_X = R_Z$  (Isotopenverhältnis des Analyten aus der Probe und aus dem Referenzmaterial)<sup>132,133</sup>. Weiterhin vereinfacht sich die Gleichung dahingehend, dass in der Analytik von Peptiden meist keine Überlappung der Isotopologen zwischen Analyten und Spike auftritt. Diesbezüglich sollte die Massendifferenz zwischen leichtem und schwerem Peptid in Relation zur Molekularmasse des Peptids mindestens 4 Da betragen<sup>116</sup>, was durch die  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Markierung ganzer Aminosäuren oder vollständiger  $^{15}\text{N}$ -Markierung meist gegeben ist. In dem Fall werden die Grenzen als  $R_X \rightarrow \infty$  und  $R_Y \rightarrow 0$  betrachtet, wodurch  $R_X$  und  $R_Y$  sich aus der Gleichung aufheben<sup>132,133</sup>. Deshalb kann unter diesen Voraussetzungen die Bestimmung der

einzelnen Isotopenverhältnisse des Analyten in der Probe  $R_X$ , im Spikematerial  $R_Y$  und im Referenzmaterial  $R_Z$  vernachlässigt werden und es wird ausschließlich das Isotopenverhältnis des Monoisotops des Analyten zum Monoisotop des Spikes in der Probenmischung und bei der doppelten Isotopenverdünnung zusätzlich in der Kalibrier Mischung bestimmt. Unter diesen Voraussetzungen vereinfachen sich die Gleichungen zur einfachen und doppelten Isotopenverdünnung zur Berechnung der Stoffmengenkonzentration von Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen folgendermaßen:

einfache IDMS:

$$c_X = c_Y \cdot \frac{m_Y}{m_X} \cdot R_{BX}$$

doppelte IDMS:

$$c_X = c_Z \cdot \frac{m_Y}{m_X} \cdot \frac{m_{ZC}}{m_{YC}} \cdot \frac{R_{BX}}{R_{BC}}$$

Die Messung von Isotopenverhältnissen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die systematische Fehler in der Quantifizierung verursachen, wie z.B. eine vom Massenspektrometer verursachte Massenverzerrung (*mass bias*) sowie der Einfluss des Linearitätsbereichs und der Totzeit des Detektors<sup>132</sup>. Mit der Anwendung des sogenannten „*exact signal matching*“-Prinzips<sup>134</sup>, was bedeutet, dass die Probenmischung  $R_{BX}$  und Kalibrier Mischung  $R_{BC}$  so justiert werden, dass die Isotopenverhältnisse gleich sind ( $R_{BX} = R_{BC}$ ), wird eine hohe Genauigkeit mit geringen Unsicherheiten erreicht, da solche systematischen Fehler unter diesen Bedingungen aufgehoben werden<sup>132,134</sup>.

### 2.3.3. Aufbau und Anwendung des Orbitrap Elite Massenspektrometers

In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem das Orbitrap Elite Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Als Hybrid-Massenspektrometer kombiniert es die lineare Ionenfalle (LIT, *linear ion trap*) der Velos Pro mit der hochauflösenden Orbitrap. Dadurch können die Vorteile beider Massenanalysatoren optimal ausgenutzt werden. So zeichnet sich die lineare Ionenfalle durch ihre hohe Sensitivität und Schnelligkeit aus, während die Orbitrap eine deutlich höhere Massengenauigkeit und Auflösung liefert. Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung zum Aufbau des Gerätesystems vom Hersteller.

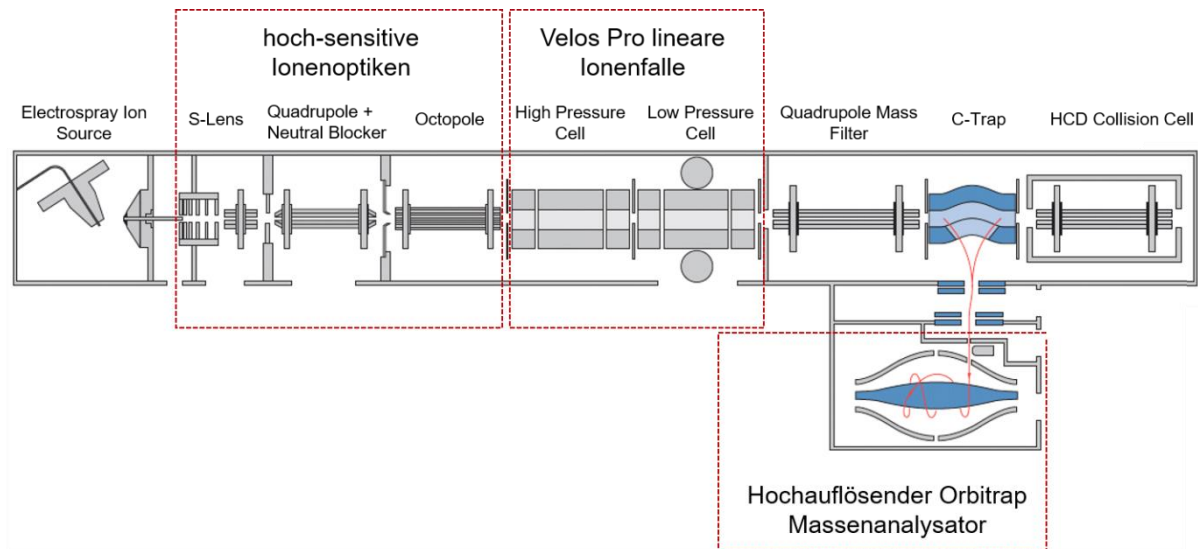


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Massenspektrometers „Orbitrap Elite“ (Thermo Scientific).

Nach der Ionisierung der zu analysieren Moleküle in der ESI-Quelle (*electrospray ionization*) werden die generierten Ionen durch die Transferkapillare in verschiedene Ionenoptiken (S-Lens, Quadrupole/Neutral Blocker, Octopole) überführt. Dort wird der Ionenstrom effizient weitergeleitet, fokussiert und potenzielle Kontaminationen und Neutralteilchen werden abgeleitet<sup>135</sup>. Anschließend durchläuft der Ionenstrom die lineare Ionenfalle der Velos Pro, die aus einer Hochdruck- und Niederdruck-Zelle besteht. Die zu analysierenden Peptide als sogenannte *Precursor*-Ionen werden in der Hochdruckzelle isoliert und können gleichzeitig mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (*CID*, *collision-induced dissociation*) fragmentiert werden<sup>135</sup>. Bei der Fragmentierung von Peptiden können die Bindungen im Peptid-Rückgrat gespalten werden, wodurch drei verschiedene Ionenserien abhängig von der verwendeten Fragmentierungsmethode produziert werden. Die entsprechende Roepstorff-Fohlman-Nomenklatur<sup>136</sup> dieser Ionenserien ist in Abbildung 9 dargestellt. Durch die Spaltung zwischen dem  $\alpha$ -Kohlenstoff und der Carbonylgruppe ( $-\text{CHR}-\text{CO}-$ ) entstehen  $a/x$ -Ionenserien, durch die Spaltung der Peptidbindung ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ )  $b/y$ -Ionenserien und durch Spaltung der Amino-Alkyl-Bindung ( $-\text{NH}-\text{CHR}$ )  $c/z$ -Ionenserien.

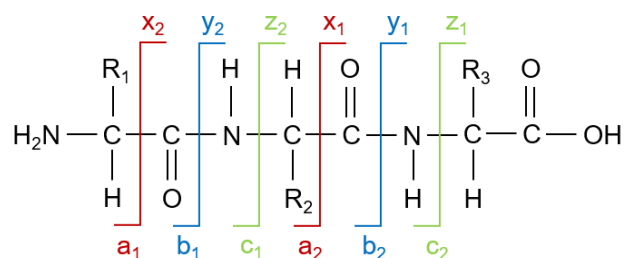


Abbildung 9: Ionenserien bei der Fragmentierung von Peptiden.

Bei der CID-Fragmentierung zerfallen die in der Ionenfalle isolierten *Precursor*-Ionen durch Stöße mit einem neutralem Kollisionsgas (meistens Helium) in sogenannte Fragmentionen, wobei bevorzugt b- und y-Ionenserien entstehen<sup>137</sup>. Die CID-Fragmentierung in der linearen Ionenfalle verläuft mit geringer Energie ( $< 2$  eV) und wird vor allem für die Sequenzierung zweifach geladener Peptide in *bottom-up*-Analysen angewendet<sup>138</sup>. Die Fragmentionen werden nach  $m/z$  in der Niederdruckzelle der linearen Ionenfalle getrennt, die anschließend durch zwei Sekundärelektronenvervielfachern detektiert werden (siehe Abbildung 8, Kreise an der Niederdruckzelle). Alternativ können die Fragmentionen über einen weiteren Quadrupol weiter über die C-Trap zur Orbitrap weitergeleitet werden, wo sie mit höherer Massengenauigkeit detektiert werden können. Zudem bietet das Gerätesystem die Möglichkeit der CID-Fragmentierung mit höherer Energie ( $\sim 100$  eV), was als höhere-Energiekollisionsinduzierte Dissoziation (*HCD, higher energy collisional dissociation*) bezeichnet wird<sup>138</sup>. Diese Art der Fragmentierung findet in einer separaten Kollisionskammer statt, die sich direkt hinter der C-Trap befindet (siehe Abbildung 8). Die HCD-induzierten Fragmentionen sind ebenfalls b- und y-Ionenserien und werden in der Orbitrap analysiert. Mit der HCD-Fragmentierung können vor allem Ionen mit niedrigen  $m/z$ -Werten hoch-aufgelöst detektiert werden, weshalb sie sich vor allem für die Analyse von Reporter-Ionen von iTRAQ- oder TMT-Tags eignet<sup>139,140</sup>. Die dritte Möglichkeit der Peptidfragmentierung ist die Elektronentransfer-Dissoziation (*ETD, electron transfer dissociation*), bei der Elektronen durch ein stabiles Radikalanion auf das *Precursor*-Ion übertragen werden<sup>141</sup>. Dabei werden bevorzugt c- und z-Ionenserien erzeugt. Das ETD-Modul ist am Ende des Orbitrap-Elite-Gerätesystems nach der HCD-Zelle lokalisiert, was in der Abbildung 8 nicht dargestellt ist. Die ETD-Fragmentierung eignet sich vor allem für die Analyse labiler post-translationaler Modifikationen wie Phosphorylierungen und höhergeladener Moleküle ( $z > 2$ ), wie z.B. sehr langen Peptiden bis hin zu ganzen Proteinen<sup>142–144</sup>. Vor allem für die Peptid- bzw. Protein-Identifizierung in biologischen Proben eignet sich dieses Orbitrap Elite Hybridsystem aus linearer Ionenfalle und Orbitrap. Die *Precursor*-Ionen werden mit hoher Massengenauigkeit in der Orbitrap bei einer Auflösung von 240.000 im Survey-Scan (Precursor-Scan,  $MS^1$ ) erfasst und parallel erfolgt eine datenabhängige (*data dependent acquisition*) CID-Fragmentierung z.B. der häufigsten Top 20 *Precursor*-Ionen in der linearen Ionenfalle in einer Gesamt-Zykluszeit von 2,5 s<sup>135</sup>. Dadurch entsteht eine Vielzahl an Fragmentionenspektren, die auch als Tandem-Massenspektren ( $MSMS$ ,  $MS^2$ ) bezeichnet werden. Die generierten  $MS^1$ - und  $MS^2$ -Spektren werden zur Identifizierung von Peptiden durch einen Vergleich der Daten mit einer Proteindatenbank z.B. SwissProt herangezogen. Für die Auswertung wurde in dieser Arbeit die Software „Proteome Discoverer“ genutzt und der Sequest-Algorithmus<sup>145</sup> angewendet. Sequest evaluiert die eingesetzte Proteindatenbank nach möglichen Peptidkandidaten, die mit der experimentellen Peptid-Precursor-Masse aus

dem MS<sup>1</sup>-Spektrum übereinstimmen. Von jedem Peptid-Kandidaten wird ein theoretisches MS<sup>2</sup>-Spektrum erstellt, das dann mit dem experimentellen MS<sup>2</sup>-Spektrum nach dem Prinzip der Kreuzkorrelation verglichen wird<sup>146</sup>. Die Übereinstimmung der Peptid-Spektren (PSMs, *peptide-spectrum matches*) wird entsprechend bewertet und die Sequenz des Peptid-Kandidaten mit der besten Übereinstimmung wird als Treffer angegeben<sup>147</sup>. Der ausgegebene Xcorr-Wert (*cross correlation*) ist ein Maß für die Güte dieser Übereinstimmung<sup>146</sup>. Die Qualität bezüglich der korrekten PSM-Identifizierung wird durch einen Schwellenwert bestimmt, der zwischen positiven und negativen PSMs unterscheidet. Dafür wird die sogenannte *False Discovery Rate* (FDR) ermittelt<sup>147</sup>. Dazu wird automatisch aus der genutzten Protein-Datenbank eine sogenannte künstliche *Decoy*-Datenbank generiert, bei der alle Sequenzen revers aufgeführt werden, weshalb erwartungsgemäß keine richtige Zuordnung erfolgen kann<sup>147</sup>. Deshalb sind alle identifizierten PSMs aus der *Decoy*-Sequenz falsch, woraus schließlich die FDR ermittelt werden kann. Mit diesem Wert kann dann ein Signifikanzschwellenwert festgelegt werden, ab wann ein Treffer als richtig gezählt wird.





### **3. Experimenteller Teil**

Dieses Kapitel beschreibt alle experimentellen Arbeiten und verwendeten Methoden. Alle dazu benötigten Materialien wie Chemikalien, Puffer, Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Kapitel 6.4 „Materialien“ (siehe Anhang, Seite 122) explizit aufgelistet.

#### **3.1. Zellkultur und virologische Arbeiten**

##### **3.1.1. Zellkultivierung und Passagierung**

Für Zellkulturarbeiten wurden die humane T-Zelllinie Jurkat und die HeLa-Zelllinie (CD4<sup>+</sup>) TZM-bl verwendet. Die Eigenschaften der Zelllinien, die für die Zellkultur verwendeten Chemikalien und die Medien-Zusammensetzung sind im Anhang, Abschnitt 6.4.1 „Zelllinien und Zellkulturmedien“ (Seite 122) zusammengefasst. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C ± 2 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Die Jurkat-Zelllinie als Suspensionskultur wurde in cRPMI-Medium kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Dichte von 90 %. Dafür wurden die Zellen in 50 mL-Falcongefäße überführt und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und entsprechend seiner Dichte verdünnt und neu in Kultur gesetzt.

Die Kultivierung der TZM-bl-Zelllinie als adhärente Monolayer erfolgte in DMEM-Medium. Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80-90 %. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin für ca. 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde mit doppeltem Volumen an Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend in 50 mL-Falcongefäßen für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Medium gelöst und im Verhältnis 1:3 neu eingestreut.

##### **3.1.2. Zellzahlbestimmung**

Für die Zellzahlmessung wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben, geerntet und 10 µL der Zellsuspension in 10 mL Isoton verdünnt (Verdünnungsfaktor: 1000). Die Zellzahlbestimmung erfolgte anschließend mit dem Z2 Beckman Cell Counter-Gerät.

Alternativ wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer kalkuliert. Dazu wurden 10 µL der Zellsuspension mit 90 µL Trypanblau vermischt und davon 10 µL auf die Zählkammer gegeben. Die lebenden Zellen (nicht-blau gefärbte Zellen) wurden aus 4 Großquadraten unter dem inversen Mikroskop gezählt. Der Durchschnitt der 4 Quadrate multipliziert mit 100.000 ergibt den Wert für die Zellzahl in Zellen pro mL.

### **3.1.3. Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Zur Kryokonservierung wurde das Zellpellet in 1 mL Gefriermedium (10 % DMSO in FKS) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Für die Langzeitlagerung wurde flüssiger Stickstoff verwendet.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen und das Kulturmedium im 37 °C Wasserbad erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden in 1 mL Medium versetzt und die Lösung in 15 mL Medium in einem Falcon-Gefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit frischem Medium gewaschen, um restliches DMSO aus dem Gefriermedium zu entfernen. Dazu wurden die Zellen für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und in frisches Medium aufgenommen.

### **3.1.4. Virusexpansion und Verarbeitung des HIV-Materials**

Das für die Arbeit benötigte HIV-Material wurde in Zellkultur hergestellt. Dafür wurden  $4 \times 10^7$  Zellen der humanen T-Zelllinie Jurkat pro Virusanzucht in 50 mL Falcongefäße aliquotiert und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Für die Virus-Adsorption wurde das Zellpellet mit zwei 1 mL-Aliquoten der Virus-Stocklösung (HIV-Stamm HIV-1<sub>BRU</sub>, siehe Seite 123) resuspendiert und bei 37 °C inkubiert. Nach 20-30 min Zeitintervallen wurde die Suspension sorgfältig gemixt und nach insgesamt 2 h Inkubationszeit auf ein Volumen von 30 mL mit RPMI-Kulturmedium versetzt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert, das infizierte Zellpellet in 10 mL RPMI-Medium resuspendiert und zu gleichen Teilen in zwei T-75 Flaschen aufgeteilt. 25 mL RPMI-Medium wurden pro Flasche auf ein Endvolumen von 30 mL hinzugefügt. Die Kulturflaschen wurden bei 37 °C  $\pm$  2 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellkultur wurde täglich bezüglich des cytopathischen Effektes (CPE) unter dem inversen Mikroskop oder mithilfe des EVOS FL Color Imaging Systems beobachtet. Bei starkem Eintreten des CPE's in Form von Synzytien-Bildungen (mehrkernige Zellen) wurde das Virusmaterial nach ca. 7-14 Tagen geerntet. Dazu wurden die verbliebenen Zellbestandteile mittels Zentrifugation bei 1200 rpm, 4 °C für 10 min abgetrennt und das Virus-enthaltene Kulturmedium anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Um die Virusüberstände als homogenes Probenmaterial mit ausreichender Viruskonzentration verwenden zu können, wurden diese über Ultrazentrifugation weiter gereinigt und gleichzeitig aufkonzentriert. Dazu wurden 15 mL einer Saccharose-Lösung (15 % Saccharose in PBS-Puffer) in Polypropylen-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig bis zu 20 mL Virus-Kulturüberstand darüber geschichtet. Die Röhrchen wurden vollständig mit PBS aufgefüllt, austariert und in die Rotor-Tubes des Rotors SW-32 Ti gesetzt und fest verschlossen. Die Proben wurden 80 min bei 20.000 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge Optima L-80XP (Beckman Coulter GmbH) zentrifugiert. Das Viruspellet wurde in 5 mL PBS-Puffer gelöst und sorgfältig für 30 min bei 150 rpm und 4 °C auf einem Flachsüttler homogenisiert, anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### **3.1.5. Herstellung von isotoopenmarkiertem Virusmaterial**

Für die Herstellung von isotoopenmarkiertem Virusmaterial wurde die metabolische Markierungstechnik SILAC, angelehnt an das Protokoll von Li und Ramratnam<sup>148</sup> angewendet. Dazu wurde die Jurkat-T-Zelllinie mit den isotoopenmarkierten Aminosäuren  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -Lysin und  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -Arginin markiert, indem sie im entsprechenden SILAC-RPMI-Medium unter regelmäßigen Medium-Wechsel kultiviert wurde. Insgesamt erfolgten 6 Passagierungen der Zellen, die jeweils nach 3-4 Tagen durchgeführt wurden. Alle weiteren Schritte wurden so durchgeführt wie im vorherigen Abschnitt „Virusexpansion und Verarbeitung des HIV-Materials“ (Seite 28) beschrieben. Das mittels Ultrazentrifugation gereinigte isotoopenmarkierte Virusmaterial wurde in PBS-Puffer bei -80 °C gelagert.

### **3.1.6. Virustitration (TCID<sub>50</sub>-Assay)**

Der aktive, infektiöse Virustiter wurde mit dem TCID<sub>50</sub> (50 % *tissue culture infectious dose*) - Assay, einer Verdünnungsendpunkt-Methode, bestimmt. Der Verdünnungsendpunkt entspricht der Virusverdünnung bei der 50 % der Zellkulturen infiziert wurden. Für die Bestimmung des TCID<sub>50</sub>-Wertes wurde eine Virus-Verdünnungsreihe (5-fach Verdünnungen) direkt in einer 96-well-Platte mit einer Multipipette angefertigt. Dazu wurden zu allen 96 wells 100 µL DMEM-GM-Medium vorgelegt. Für die Virus-Verdünnungsreihe wurden 25 µL der Virussuspension in Spalte 1 der Zellkulturplatte in 100 µL DMEM-GM-Medium resuspendiert und fortlaufend 25 µL bis zur Spalte 11 der Zellkulturplatte transferiert. In der letzten Verdünnungsstufe (Spalte 11) wurden 25 µL verworfen. Die Spalte 12 der Zellkulturplatte diente als Negativkontrolle. Anschließend wurden zu jedem well jeweils 100 µL der TZM-bl-Indikatorzelllinie ( $1 \times 10^5$  Zellen pro mL in DMEM-GM) hinzugefügt und die Platten bei 37 °C

für 48 h inkubiert. Für die Auswertung der Platten wurden 100 µL Volumen aus jedem *well* entfernt und die verbliebenen 100 µL mit 100 µL rekonstituiertem Britelite™ Substrat versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zell-Lyse zu vervollständigen. Die Lumineszenz-Signale wurden im Plattenlesegerät „Synergy™ H4 Hybrid Reader“ ausgelesen und in einem Microsoft-Excel-Datenblatt ausgegeben. Für die Festlegung des Negativwertes wurde der Durchschnitt der Lumineszenz-Werte der Negativkontrolle (Spalte 12 der Kulturplatte) gebildet und mit dem Faktor 2 multipliziert. Alle Lumineszenz-Werte der Virus-Verdünnungsreihe von Spalte 1-11 der Kulturplatte, die den ermittelten Negativwert überschreiten, wurden als positiv gezählt. Um den TCID<sub>50</sub>-Wert von HIV-positiven Proben zu bestimmen, wurde eine 4-fache Virusverdünnungsreihe z.B. von Reihe A-D einer Kulturplatte angefertigt und entsprechend ausgewertet. Darauf basierend wurde der TCID<sub>50</sub>-Wert nach der Methode von „Reed and Muench“<sup>149</sup> unter Verwendung eines bereits durch Brett D. Lindenbach etablierten Excel-Datenblatts „*infectivity calculator*“ kalkuliert.

### 3.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die Darstellung der HIV-Probenmatrix eignet sich vor allem die Negativ-Kontrastierung und Messung an einem Transmissionselektronenmikroskop. Dazu wurde das nach Ultrazentrifugation erhaltene HIV-Viruspellet zur Fixierung von Proteinstrukturen und Membranen in 70 µL oder 200 µL Fixierlösung (50 mM HEPES-Puffer, 2 % Glutaraldehyd und 5 % Formaldehyd) vorsichtig gelöst. Diese Fixierung führt gleichzeitig zu einer Inaktivierung des Materials. Die weitere Probenvorbereitung und die elektronenmikroskopische Analyse des Virusmaterials wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Manfred Rohde vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung durchgeführt. Für die Negativ-Kontrastierung wurde das Schwermetall Uran in Form von wässriger 2%iger Uranylacetat-Lösung (pH 4,0) verwendet. Der Trägerfilm, der auf ein Kupfernetz aufgebracht ist, wurde mit seiner kohlebefilmten Seite ca. 1 min auf einen Tropfen der inaktivierten HIV-Proben gelegt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend wurde der Trägerfilm ca. 1 min in der Uranylacetat-Lösung gelegt. Die überschüssigen Flüssigkeiten wurden nach jedem Schritt über ein Filterpapier abgesaugt. Die getrockneten Trägerfilme wurden anschließend am Zeiss TEM910 Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt.

### 3.3. Nukleinsäure-Analytik

#### 3.3.1. Extraktion von viraler RNA

Für die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration in den hergestellten HIV-Suspensionen (siehe Abschnitt „3.1.4 Virusexpansion und Verarbeitung des HIV-Materials“, Seite 28) wurden 140 µL der präparierten HIV-Stocks für die RNA-Extraktion eingesetzt. Die Extraktion der viralen RNA erfolgte mithilfe des QIAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen). Dazu wurde das Probenmaterial in 560 µL präparierten Lysepuffer [10 µL carrier RNA-AVE (1 µg/µL) pro 1 mL Lysepuffer] resuspendiert und die Lösung in ein frisches 1,5 mL Eppendorf-Gefäß (DNA LoBind) überführt. Die Lyse erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 560 µL Ethanol absolut der Proben hinzugesetzt. Die anschließende Reinigung der RNA über Kieselgel-Membransäulen erfolgte nach Herstellerprotokoll des RNA-Extraktionskit von Qiagen. Die Elution der RNA erfolgte mit 60 µL Elutionspuffer. Die RNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.2. cDNA-Synthese – Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese wurde mit dem „MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis Kit“ (Epicentre) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

##### Pre-Annealing-Mix (PA-Mix)

Komponenten	Konz. Stock	Konz. final	1x
RNA		0,1-1 µg	x µL
Oligo(dT) <sub>21</sub> Primer	10 µM	1,6 µM	2 µL
oder			
Random 9-mer Primer	50 µM	4 µM	1 µL
oder			
LTR-fulllength-as	10 µM	0,8 µM	1 µL
RNase-freies Wasser	auf Gesamtvolumen von		12,5 µL

Für quantitative Messungen der HIV-Proben wurden immer 10 µL extrahierte RNA und der HIV-sequenzspezifische Primer LTR-fulllength-as (Sequenz siehe Tabelle 27, Seite 127) eingesetzt. Der 12,5 µL PA-Mix wurde bei 65 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und 7,5 µL 1st-strand cDNA synthesis Mix hinzugesetzt:

**1st-strand cDNA synthesis Mix**

Komponenten	Konz. Stock	Konz. final	1x
MMLV RT 10x Reaction Buffer	10x	1x	2 µL
DTT (100 mM)	(100 mM)	10 mM	2 µL
dNTP PreMix	5 mM (jedes)	0,5 mM (jedes)	2 µL
RiboGuard RNase Inhibitor	40 U/µL	1 U/µL	0,5 µL
MMLV Reverse Transcriptase	50 U/µL	2,5 U/µL	1 µL
			7,5 µL Mix
			+ 12,5 µL PA-Mix
<b>Gesamtvolumen:</b>			20 µL

Das optimierte Thermocycler-Programm am „Eppendorf Mastercycler Thermal Cycler“ wurde wie folgt ausgewählt:

PCR-Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	1	50 °C	2 h
Termination	1	85 °C	5 min
Hold	1	4 °C	∞

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Für die Quantifizierung der DNA mittels ddPCR erfolgte der Transport der cDNA auf Trockeneis zur PTB in Berlin. Die Ergebnisse zur Methoden-Optimierung sind in Abschnitt „4.5.1 Optimierung der cDNA-Synthese“ (Seite 88) zusammengestellt.

### 3.3.3. Photometrische Analyse von Nukleinsäuren

Der Gesamtgehalt an RNA nach der RNA-Extraktion, sowie DNA-Gehalt nach der cDNA-Synthese wurde photometrisch am NanoDrop 2000c (peqlab) bestimmt. Für die Nukleinsäure-Bestimmung wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm aus 1 µL Probe gegen den Eluenten als Blank-Messung analysiert. Für die Beurteilung der Qualität der Proben wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm und 230 nm gemessen. Der Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  entspricht der Qualität der RNA-Präparation in Bezug auf Protein-Kontaminationen und sollte idealerweise für reine RNA-Präparationen bei ~ 2 und für reine DNA-Präparationen bei ~ 1,8 liegen. Ein Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} < 2,0 - 2,2$  weist auf Rückstände von niederen Molekülen wie Phenol und EDTA hin. Die Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte mit der Annahme, dass die RNA-Konzentration 40 µg/mL und die DNA-Konzentration 50 µg/mL entspricht, wenn  $A_{260\text{nm}} = 1$ .

### 3.3.4. qPCR-Assay

Die qPCR wurde ausschließlich zur Methodenetablierung und -optimierung genutzt. Da für die HIV-Quantifizierung mittels qPCR benötigte HIV-Standards nicht zur Verfügung standen, wurde das optimierte qPCR-Verfahren anschließend auf das ddPCR-System übertragen und die Proben mittels ddPCR quantifiziert. Die verwendeten Primer- und Sonden-Paare sind in Tabelle 27 (Anhang, Seite 127) aufgelistet. Die Ergebnisse zum Primer- und Assay-Design sind in Abschnitt 4.5.2 „Primer- und Assay Design“ (Seite 90) und zur Optimierung der Assay-Parameter in Abschnitt 4.5.3 „Optimierung der Assay-Parameter“ (Seite 92) gezeigt. Hier sind jeweils die optimierten Protokolle aufgeführt. Für das qPCR-System wurde der PrimeTime Gene Expression Master Mix (IDT Inc.) verwendet. Ein PCR-Ansatz (10 µL) bestand aus folgenden Komponenten:

#### qPCR-Mix

Komponenten	Konz. final	1x
PrimeTime Gene Expression Master Mix (2x)	1x	5 µL
Primer-s	900 nM	1 µL
Primer-as	900 nM	1 µL
Sonde	250 nM	1 µL
cDNA (3 pg-100 ng)	3 pg-100 ng	2 µL

Die cDNA wurde zuvor entsprechend der photometrischen Konzentrationsbestimmung immer 1:10 oder 1:100 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Cycler-Programm am Rotor-Gene Q (Qiagen):

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Polymerase-Aktivierung	1	95 °C	10 min
Amplifikation:	45		
Denaturierung		94 °C	30 s
Annealing/Extension		58 °C	60 s
Finale Elongation	1	98 °C	10 min
Hold	1	4 °C	∞

### 3.3.5. ddPCR-Assay

Das in dieser Arbeit verwendete ddPCR-System zur Quantifizierung von HIV-cDNA ist das QX200 Droplet Digital System der Firma Bio-Rad. Ein Probenansatz betrug 20 µL und setzte sich wie folgt zusammen:

#### ddPCR-Mix

Komponenten	Konz. final	1x
ddPCR supermix for probes (no dUTP)	1x	10 µL
Aqua bidest.	-	2,95 µL
Primer-s	900 nM	0,9 µL
Primer-as	900 nM	0,9 µL
Sonde	250 nM	1,25 µL
cDNA (3 pg-100 ng)	3 pg-100 ng	4 µL

Auch für die ddPCR wurde die eingesetzte cDNA zuvor entsprechend der photometrischen Konzentrationsbestimmung immer 1:10 oder 1:100 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Der ddPCR-Proben-Mix wurden als 8-facher Ansatz mit 5%igem Überschuss hergestellt, um Pipettierfehler zu minimieren und eine 8-Proben-Cartridge zu vervollständigen. Dazu wurde die Cartridge in die entsprechende Halterung eingesetzt und jeweils 20 µL des ddPCR-Proben-



Mix in einem Cartridge-Slot pipettiert. In die darunter liegenden Slots wurden jeweils 70 µL des ddPCR-Öls (*droplet generation oil for probes*) gegeben und die Cartridge mit einem Gummi-Verschluss (*gaskets*, Bio-Rad) verschlossen. Anschließend wurde die Cartridge in den QX200-Droplet-Generator gegeben, der aus dem ddPCR-Proben-Mix und dem Öl 40 µL Tröpfchen-Suspension generiert, indem das ursprüngliche Probenvolumen (20 µL) in bis zu 20.000 Einzeltröpfchen aufgeteilt wurde. Die 8 x 40 µL Tröpfchen-Suspension aus einer Cartridge befinden sich in den oberen Slots und wurden vorsichtig und langsam mit einer Multikanalpipette (Pipet-lite XLS + manual 8-channel pipette, Rainin) in eine ddPCR 96-well-PCR-Platte überführt. Als Negativkontrolle wurde anstelle der cDNA reines MilliQ-Wasser verwendet. Anschließend wurde die beladene Platte mit einer Folie bedeckt und im PX1 PCR Plate Sealer verschweißt. Die PCR-Reaktion wurde im C1000 Touch Cycler durchgeführt. Das verwendete PCR-Programm entspricht dem Programm für die qPCR (siehe Seite 33). Nach der PCR-Reaktion wurde die Platte im QX200-Droplet-Reader unter Verwendung von ddPCR-Droplet Reader Oil ausgelesen und die Daten mithilfe des Software-Pakets QuantaSoft 1.7 (Bio-Rad) ausgewertet. Dabei wurde der Schwellenwert der Fluoreszenz-Amplitude, der zwischen positiven und negativen Droplets unterscheidet, manuell direkt über das Cluster der negativen Droplets gesetzt. Ausschließlich Reaktionen mit mindestens 10.000 akzeptierten Tropfen wurden für die Quantifizierung ausgewertet.

Die Bestimmung der Ziel-DNA-Konzentration in der Gesamtprobe erfolgte unter Einbeziehung der Anzahl positiver Tröpfchen, Gesamtanzahl der Tröpfchen, Tröpfchen-Volumen und der Verdünnungsfaktoren des gesamten analytischen Prozesses nach folgender Gleichung:

$$c_{Probe} = Vf_{RT} \cdot Vf_{Probe} \cdot Vf_{PCR} \cdot \left( \frac{1}{N \cdot V_d} \right) \cdot \left( \ln \frac{\left( 1 - \frac{N_{pos}}{N} \right)}{\left( 1 - \frac{1}{N} \right)} \right)$$

$c_{Probe}$ : absolute Ziel-DNA-Konzentration in der Probe (Kopien/µL)

$Vf_{RT}$ : Verdünnung der RNA im Reaktionsansatz der Reversen Transkription (Faktor: 2)

$Vf_{Probe}$ : Verdünnung der cDNA-Probe (Faktor: 10 oder 100)

$Vf_{PCR}$ : Verdünnung der cDNA im ddPCR-Reaktionsansatz (Faktor: 5)

$N$ : Gesamtanzahl der Tröpfchen

$N_{pos}$ : Anzahl positiver Tröpfchen

$V_d$ : Tröpfchen-Volumen (0,87 nL)

### **3.3.6. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Molekulargewichtsgröße und Qualität der PCR-Produkte wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für die ~10 kb HIV-cDNA mit 0,8%igen Agarosegelen und für die kleineren PCR-Produkte mit 4%igen Agarosegelen. Zur Anfärbung der Nukleinsäuren wurden die Gele mit 2 % Midori Green-Lösung (Thermo Fisher) versetzt. Midori Green ist ein DNA/RNA-Farbstoff und eine Alternative zur Verwendung von Ethidiumbromid für die Nukleinsäure-Färbung in Agarosegelen. Die Auftrennung der PCR-Produkte im elektrischen Feld erfolgte bei 100 V für 60 min. Die Detektion der Farbstoff-gebundenen Nukleinsäuren erfolgte unter UV-Bestrahlung mit einem Transilluminator (Bio-Rad). Puffer- und Gel-Zusammensetzungen sind im Abschnitt „6.4.10 Puffer und Lösungen“ auf Seite 130 aufgelistet.

## **3.4. Probenvorbereitung für die Proteinanalytik**

Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang, Abschnitt 6.4.10 „Puffer und Lösungen“ (Seite 130) aufgelistet.

### **3.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für eine SDS-PAGE wurde mindestens 1 µg Protein eingesetzt. Für eine vollständige Denaturierung der Proben wurden diese mit Protein-Probenpuffer im Verhältnis 3:1 (Probe:Puffer) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden diese zusammen mit 3 µL eines Protein-Molekulargewichtsstandards (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad) zur Größenbestimmung auf ein 4-15%iges Gradientengel (Mini-Protean TGX Stain-free gel, Bio-Rad) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TGS-Puffer bei Raumtemperatur und 100 V. Zur Visualisierung von Protein-Banden auf Polyacrylamid-Gelen wurde der Coomassie G-250-Farbstoff aus dem Kit SimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Coomassie ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert, was zu einer sequenzunspezifischen Proteinfärbung führt. Für die Coomassie-Färbung wurde das Polyacrylamid-Gel nach der Gelelektrophorese 3 x 5 min mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung für 1 h mittels SimplyBlue SafeStain unter leichtem Schütteln. Der Entfärbungsprozess erfolgte auf Wasserbasis. Dazu wurde das Gel regelmäßig mit frischem Aqua dest. gewaschen. Für eine maximale Empfindlichkeit und klaren Hintergrund erfolgte der Waschgang für ca. 1 h. Die gefärbten Gele wurden am ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad)

dokumentiert und mit der Image Lab 5.2.1 Software ausgewertet. Für massenspektrometrische Analysen der Proteinbanden wurden diese steril mit einem Skalpell herausgeschnitten und für die Proteolyse im Gel, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, vorbereitet.

### 3.4.2. Proteolyse im Gel

Die Proteolyse im Gel wurde in Anlehnung an das Protokoll von Shevchenko *et al.* durchgeführt<sup>150</sup>. Dazu wurden die mit Coomassie-gefärbten Proteinbanden nach der SDS-PAGE aus dem Gel herausgeschnitten und in kleine Würfel zerkleinert. Die Gel-Würfel wurden direkt in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und in 500  $\mu$ L Acetonitril aufgenommen. Nach diesem Protokoll werden Disulfidbrücken mittels 10 mM DTT (Dithiothreitol) reduktiv gespalten und anschließend mittels 55 mM IAA (Iodacetamid) irreversibel alkyliert. Durch eine  $S_N2$ -Reaktion liegen die Cysteingruppen carbamidomethyliert vor. Da die Gelstücke danach vollständig entfärbt waren, konnte der anschließende Entfärbungsschritt laut Protokoll entfallen. Die Gelstücke wurden zunächst bei -20 °C eingefroren. Für die anschließende Proteolyse wurden die Gelstücke vollständig mit der hergestellten 12,5 ng/ $\mu$ L Trypsin-Reagenzlösung (proteomics grade, Sigma Aldrich) überdeckt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Peptid-Extraktion aus den Gelstücken, indem das doppelte Volumen an Peptid-Extraktionsmittel im Vergleich zur Trypsin-Lösung auf die Gelstücke gegeben wurde. Der Extraktionsansatz wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Peptid-Extrakt wurde in Glas-Spitzvials überführt und in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die getrockneten Extrakte wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Vor einer LC-MS-Analyse wurden die Peptide in 42  $\mu$ L 5%iger Ameisensäure (FA, *formic acid*) gelöst und über eine Millipore Ultrafree-MC-Filter-Einheit (0,45  $\mu$ m) für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert, um letzte Gel-Reste zu entfernen.

### 3.4.3. Proteolyse in Lösung

Für Proteomics-Studien wurden die Proben direkt für die Probenvorbereitung eingesetzt, wobei für quantitative Analysen zuvor die isotoopenmarkierten Standards zugesetzt wurden. Für die Denaturierung der Proben wurde 5 M Guanidinhydrochlorid in einer Endkonzentration von 2,5 M und 300 mM DTT in einer Endkonzentration von 5 mM eingesetzt. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Gefäße auf Raumtemperatur wurden die Cysteingruppen mit 300 mM IAA alkyliert. Dafür wurde das Alkylierungsmittel in einer Endkonzentration von 20 mM hinzugesetzt und die Proben 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde das restliche Alkylierungsmittel

durch einen Überschuss an DTT (Endkonzentration 80 mM) inaktiviert. Dazu wurde die Probe nochmals 30 min bei 37 °C inkubiert. Für die anschließende Proteolyse der Probe wurde zuvor die Guanidinhydrochlorid-Konzentration durch Verdünnung der Probe mit 1x PBS-Puffer auf 1,2 M reduziert. Für Proteomics-Analysen wurde 20 µg Proteomics-Grade Trypsin in einer Konzentration von 1 µg/µL schrittweise 4 x 5 µL nach jeweils 1 h zu den Proben hinzugefügt und bei 37 °C für 24 h im Eppendorf Thermomixer inkubiert. Vor jeder massenspektrometrischen Analyse wurde die Proteolyse mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gestoppt und die Proben mittels Festphasenextraktion entsalzt (siehe Abschnitt „3.4.5 Festphasenextraktion als Entsalzungsmethode“, Seite 40).

Da es für quantitative Analysen wichtig ist, eine vollständige Proteolyse zu erzielen, wurde anstelle des Proteomics-Grade-Trypsins das kostengünstigere Rindertrypsin verwendet, da es in größeren Mengen eingesetzt werden kann. Die Abläufe der Proteolyse wie z.B. die Trypsin-Zugaben wurden für quantitative Analysen der HIV-Proben automatisiert durchgeführt. Auch für die Validierung der Proteolyse auf Vollständigkeit wurde ein automatisiertes Verfahren für die Trypsin-Zugaben und Probenentnahmen im zeitlichen Verlauf eingesetzt. Dieses automatisierte Verfahren wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

### **3.4.4. Automatisierung der Proteolyse in Lösung**

Die automatisierte Durchführung der Proteolyse in Lösung für quantitative Messungen und für die Untersuchung der Proteolyse-Kinetik erfolgte mit dem MPS DualHead Robotersystem (Gerstel). Für die automatisierte Proteolyse wurde Rindertrypsin (10 µg/µL), basische Lösung (10x PBS-Puffer, Sigma-Aldrich) für die pH-Wert-Justierung auf pH 8 und saure Lösung für den Stopp der Proteolyse mit 0,1 % TFA eingesetzt. Alle Reagenzien und die Proben wurden ausschließlich in 4 mL Glasvials vorbereitet und für das Roboter-Programm eingesetzt.

#### Automatisierung der Proteolyse für HIV-Quantifizierung:

Für die Quantifizierung von HIV-Proteinen wurden 100 µL HIV-Probe und die isotoopenmarkierten Standards (siehe Anhang, Tabelle 24 und Tabelle 25, Seite 125-126) eingewogen. Nach der Probenvorbereitung (siehe Abschnitt 3.4.3) bezüglich der Denaturierung, Alkylierung und Stopp der Alkylierung betrug das Probenendvolumen 300 µL. Um die Guanidinhydrochlorid-Konzentration zu reduzieren, wurde das Probenvolumen mit 1x PBS-Puffer auf 500 µL versetzt und 25 µL basische Lösung hinzugegeben. Diese Proben wurden anschließend für das automatisierte Proteolyse-Verfahren eingesetzt. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 50 µL Rindertrypsin gestartet und durchgehend bei 37 °C im Agitator-Modul des Roboters

inkubiert. Es folgten weitere je 25 µL Trypsin-Zugaben nach 1 h, 2 h, 4 h und 6 h Inkubationszeit mit anschließender Zugabe von 25 µL basischer Lösung zur pH-Wert-Justierung. Nach 24 stündiger Inkubation wurde die Proteolyse durch Zugabe von 300 µL TFA (0,1 %) gestoppt. Alle unlöslichen Bestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm für 10 min entfernt und die klare Lösung vor der LC-MS-Analyse mittels Festphasenextraktion entsalzt (siehe Abschnitt 3.4.5).

#### Automatisierung der Proteolyse für Kinetik-Studien:

Um genügend Probenmaterial für die Bestimmung einer Proteolyse-Zeitreihe zu erhalten, wurde das doppelte Probenmaterial im Vergleich zu den reinen Quantifizierungsexperimenten eingesetzt. Dies bedeutet, dass 200 µL HIV-Probenmaterial vorbereitet und am Ende 1000 µL Probe für die automatisierte Proteolyse eingesetzt wurden. Die Proteolyse der Probe wurde mit Zugabe von 100 µL Rindertrypsin gestartet. Die Reaktion wurde durchgehend im Agitator-Modul bei 37 °C inkubiert. Für die Erstellung von Zeitreihen wurden jeweils 75 µL Proben-Aliquote nach 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 36 h und 48 h Inkubationszeit entnommen. Um eine weitere Proteolyse in den Probenentnahmen zu stoppen, wurden automatisiert zusätzlich 75 µL saure Lösung (0,1 % TFA) hinzugegeben und bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlblock des Robotersystems gelagert. Nach bestimmten Inkubationszeiten während der Proteolyse bei 37 °C z.B. nach 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h oder nach 1 h, 2 h, 4 h, 10 h wurden automatisch zusätzlich 50 µL frische Trypsin-Aliquote (10 µg/µL) der Probe zugesetzt und für die erneute pH-Wert-Einstellung jeweils 25 µL Base (10x PBS-Puffer). Für den Fall einer Probenentnahme und Trypsin-Zugabe zum gleichen Zeitpunkt wurde vom Robotersystem zuerst ein Proben-Aliquot entnommen und anschließend frisches Trypsin gefolgt von der basischen Lösung zur Probe zugegeben. Abschließend wurde die Proteolyse von jeder entnommenen Probe mit 75 µL 0,1 % TFA gestoppt. Alle Probenentnahmen von einer Zeitreihe wurden vor der LC-MS-Messung mit der Festphasenextraktion entsalzt, getrocknet und in den LC-Plastik-Vials (Polypropylen) in 60 µL 0,1 % Ameisensäure gelöst. Jeweils 20 µL der einzelnen Probenentnahmen wurden für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt.

### 3.4.5. Festphasenextraktion als Entsalzungsmethode

Die Festphasenextraktion (*solid phase extraction, SPE*) dient der Reinigung bzw. Entsalzung und Konzentrierung von Analyten. Sie beruht auf einem physikalischen Trennprinzip mittels einer flüssigen und festen Phase (Sorbens). Abhängig von den Eigenschaften der zu trennenden Analyten werden unterschiedliche SPE-Kartuschen (Sorbens) kommerziell angeboten. In dieser Arbeit wurde die Festphasenextraktion nach der Proteolyse angewendet, um die Peptide von Puffersalzen abzutrennen und um sie für die massenspektro-metrische Analyse zu konzentrieren. Dazu wurden „Chromabond C18 ec“ SPE-Kartuschen (Macherey-Nagel GmbH) verwendet. Die stationäre Phase basiert auf einem octadecyl-modifizierten Kieselgel und ist u.a. für die Entsalzung von Proben geeignet. Die Kartuschen wurden an einer Vakuumextraktionskammer Visiprep DL (Supelco Inc) angebracht und die stationäre Phase mit 4 Säulenvolumen Methanol aktiviert. Anschließend wurden die Kartuschen mit 4 Säulenvolumen Waschlösung (0,1 % TFA in Aqua dest.) equilibriert und die Proben in 0,1 % TFA aufgetragen. Die hydrophoben Bereiche der Peptide binden am unpolaren Sorbens. Restliche Salze und polare Bestandteile wurden mit 2 Säulenvolumen Waschlösung (0,1 % TFA in Aqua dest.) aus den Kartuschen gespült. Anschließend erfolgte die Elution der Peptide mit 2x 1,5 mL Elutionsmittel (80 % Acetonitril und 0,1 % TFA) in ein Reagenzglas. Das Elutionsmittel wurde in einer Vakuum-Zentrifuge entfernt und die getrockneten Peptide im gewünschten Volumen (0,1 % FA) für die LC-MS-Analytik gelöst und in ein LC-Vial überführt.

### 3.4.6. Reverse Phase- und Kationenaustausch-Chromatographie

Die semi-präparative Reinigung von Peptiden oder die Fraktionierung von Proben erfolgte entweder mittels Reversed-Phase (RP)- oder Kationenaustausch (SCX, *strong cation exchange*)-Chromatographie an der HPLC-Anlage VWR Hitachi Chromaster. Die Geräte-Parameter sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Für die RP-Chromatographie wurde die Jupiter C18 (300 Å, 5 µm, 250 x 10 mm, Phenomenex) mit Vorsäule verwendet. Die Säule wurde 30 min unter Startbedingungen mit 95 % Eluent A (MilliQ-Wasser und 0,1 % TFA) und 5 % Eluent B (Acetonitril und 0,1 % TFA) equilibriert. Die Flussrate betrug 1,5 mL/min. Der Gradient lief 50 min linear von 95 % auf 5 % Eluent A. Die Lagerung der Säule erfolgte in 65 % Acetonitril/ MilliQ-Wasser.

Die SCX-Chromatographie erfolgte mit der SCX-Säule Luna (100 Å, 5 µm, 250 x 10 mm, Phenomenex) mit Vorsäule. Das Equilibrieren der Säule erfolgte für 30 min mit 100 % Eluent A (5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 % Acetonitril, pH 2,8 titriert mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Die Flussrate betrug 2,5 mL/min. Der Gradient lief 40 min linear von 100 % Eluent A auf 100 % Eluent B (5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM KCl, 25 % Acetonitril, pH 2,8 titriert mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Für die Lagerung der Säule wurden

zunächst die Salze durch 30minütiges Spülen mit MilliQ-Wasser entfernt. Die Lagerung erfolgte anschließend in reinem Methanol (30 min spülen).

**Tabelle 1: Geräte Parameter der HPLC-Anlage VWR Hitachi Chromaster**

Parameter	Werte
Ofentemperatur	23 °C
Max. Säulentemperatur	50 °C
Wellenlänge	220 nm
Response Time	0,5 s
Sampling Period	100 ms (10 Hz)

### 3.5. Proteinanalytik mittels Western-Blot

Für eine Western-Blot-Analytik wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (siehe Abschnitt 3.4.1, Seite 36) mithilfe des Trans-Blot Turbo Transfer Systems (Bio-Rad) aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das Gel nach der SDS-PAGE in MilliQ-Wasser gewaschen und anschließend 15 min in Trans-Blot Turbo Transferpuffer (Bio-Rad) equilibriert. Die PVDF-Membran (0,2 µm Porengröße) wurde 5 min in Methanol aktiviert, anschließend in MilliQ-Wasser gewaschen und zusammen mit den benötigten Filterpapieren in Transferpuffer equilibriert. Die Membran, das Gel und die Filterpapiere wurden für den Blot luftblasenfrei in der Transferkassette zusammengebaut. Der Proteintransfer für ein Mini-TGX-Gel erfolgte mit einem etablierten 3-minütigen Protokoll des Transfer-Systems.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mit Blocking-Lösung in einem 50 mL-Falconröhrchen auf einem Rollenschüttler für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen primären Antikörper in geeigneter Verdünnung (siehe Seite 127) in Blocking-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 5 mL TBS-T für 5 min erfolgte ein letzter Waschschriff mit TBS. Der mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in geeigneter Verdünnung in Blocking-Lösung hergestellt (siehe Seite 127) und die Membran darin für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten erneut ein drei-maliger Waschschriff mit 5 mL TBS-T für jeweils 5 min und ein letzter Waschschriff mit TBS. Die Detektion erfolgte mit dem Clarity Western ECL-Substrat (Bio-Rad). Dazu wurde die Membran 2-3 min in der ECL-Lösung inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem ChemiDoc Touch Imaging System der Firma Bio-Rad. Für die Daten-Auswertung wurde die Software Image Lab 5.2.1 verwendet.

### 3.6. Proteinanalytik am LC-ESI-Orbitrap Elite Gerätesystem

Für alle massenspektrometrischen Analysen wurde das Thermo Scientific LTQ Orbitrap Elite Hybridmassenspektrometer in Kombination mit dem Agilent 1200 LC-System verwendet. Die eingesetzten analytischen Proben wurden nach der Proteolyse im Gel oder in Lösung (siehe Abschnitte 3.4.2 und 3.4.3, Seite 37) mittels SPE (siehe Abschnitt 3.4.5, Seite 40) entsalzt. Für die LC-gekoppelte MS-Analyse wurden die Proben mittels RP-Chromatographie unter Verwendung der zwei mobilen Phasen Eluent A (MilliQ-Wasser/ 0,1 % FA) und Eluent-B (Acetonitril/ 0,1 % FA) folgendermaßen getrennt: 0-10 min 95 % A, linearer Gradient von 10-55 min 95-10 % A, 55-60 min 10 % A, 60-61 min 10-95 % A, 61-90 min 95 % A. Die Flussrate betrug bei jeder Anwendung 0,2 mL/min und die Ofentemperatur 25 °C. Die wichtigen Grundeinstellungen des LTQ Orbitrap Elite Massenspektrometers sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Grundeinstellungen des LTQ Orbitrap Elite Massenspektrometer**

Tune-File Einstellungen	
Ionisierungsquelle	HESI ( <i>Heated Electrospray Ionization</i> )
Temperatur der Quelle (°C)	300
Temperatur der Transferkapillare (°C)	320
<i>sheath gas flow</i>	36
<i>auxiliary gas flow</i>	17
LIT Full AGC ( <i>automatic gain control</i> )	30.000
LIT SIM AGC	10.000
LIT MSn AGC	10.000
FTMS Full AGC	1.000.000
FTMS SIM AGC	100.000
FTMS MSn AGC	200.000
positive Polarität	
Spannung der Quelle (kV)	4,2
Stromstärke der Quelle (uA)	100
<i>S-Lens RF Level (%)</i>	61
<i>Multipole RF Amplifier (Vp-p)</i>	800
<i>LIT micro scans</i> für Full, SIM, MSn	1
<i>LIT max ion time (ms)</i>	50
<i>FTMS micro scans</i> für Full, SIM, MSn	1
<i>FTMS max ion time (ms)</i>	300



### 3.6.1. Analyseverfahren zur Quantifizierung von HIV-Proben

Für die Quantifizierung von Peptiden wurden entsprechende isotoopenmarkierte Spike-Materialien bekannter Konzentration eingesetzt. Nach der Proteolyse und Entsalzung der Proben wurden sie für die LC-MS-Messung eingesetzt. Die massenspektrometrische Analyse der Precursor-Ionen erfolgte im Scan-Modus mit dem Orbitrap-Massenanalysator unter folgenden Parametern: Scan-Bereich  $m/z$  300-1000, 60.000 Auflösung, Full-Scan. Die Auswertung erfolgte mit der XCalibur-Software von Thermo Scientific. Für die Quantifizierung wurden spezifische Ionen der Peptide aus dem Chromatogramm extrahiert, was auch als *extracted ion chromatogram* (EIC) bezeichnet wird. Dabei erfolgte die Extraktion der Ionen-Chromatogramme nach der monoisotopischen Masse des natürlichen Precursor-Ions und des isotoopenmarkierten Precursor-Ions in einem Bereich von  $\pm 10$  ppm. Die analysierten  $m/z$ -Werte der Precursor-Ionen sind in Tabelle 32 (Anhang, Seite 140) aufgeführt. Die Flächen der EIC für natürliches und isotoopenmarkiertes Precursor-Ion wurden zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse verwendet. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Gleichung der einfachen Isotopenverdünnung (siehe Seite 20).

### 3.6.2. Tandem-Massenspektrometrie (MSMS)

Die spezifische Identifizierung von Peptiden erfolgte mittels Tandem-Massenspektrometrie bzw. MSMS-Messungen. Die Precursor-Ionen wurden, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, in der Orbitrap detektiert (Scan-Bereich:  $m/z$  115-1000, 60.000 Auflösung, Full-Scan), in der linearen Ionenfalle selektiert und mittels CID fragmentiert (norm. Kollisionsenergie 35, Isolationsweite 2). Mehrere Peptide wurden entweder gleichzeitig über die gesamte Messzeit gemessen oder entsprechend ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten in einzelne Mess-Segmente unterteilt. Die Extraktion der Ionenchromatogramme erfolgte nach der monoisotopischen Masse des Precursor-Ions und zusätzlich nach dem intensivsten Fragmention mit jeweils einer Differenz von  $\pm 10$  ppm. Die  $m/z$ -Werte der Precursor- und Fragmentionen sind in Tabelle 32 (Anhang, Seite 140) aufgeführt. Für die Quantifizierung wurden die Flächen der EIC vom natürlichen und isotoopenmarkierten Peptid ins Verhältnis gesetzt.

### 3.6.3. Messung und Auswertung von Peptide Mapping Experimenten

Für Peptide Mapping Experimente wurden die Proben entweder direkt nach einer einfachen Entsalzung (SPE) eingesetzt oder mehrere gesammelte Fraktionen einer Probe aus der semi-präparativen RP-Chromatographie analysiert. Für die LC-gekoppelte Massenspektrometrie wurde die analytische Säule Jupiter C18 300 Å mit Vorsäule von Phenomenex genutzt. Der Gradient verlief von 5-45 min linear von 5 % A auf 90 % A. Die massenspektrometrischen Parametereinstellungen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Messparameter der LTQ Orbitrap Elite für Peptide-Mapping Experimente**

Parameter der FTMS	
Auflösung	60.000
<i>m/z</i> Bereich	300-1700
Parameter der ITMS	
MSMS	Top20
Fragmentierungstyp	CID
norm. Kollisionsenergie	35
min. Signalintensität ( <i>counts</i> )	500
<i>isolation width</i>	2
Grundladungszustand ( <i>default charge state</i> )	2
Parameter der <i>data dependent settings</i>	
<i>neutral loss in top</i>	3
<i>product in top</i>	3
keine Analyse von einfach-geladenen Ionen	angewendet
Parameter der <i>global data dependent settings</i>	
Vorhersage der Ionen-Injektionszeit	angewendet
<i>exclusion mass width</i>	1
<i>parent mass width</i>	1
<i>FT SIM scan mass width low</i>	5
<i>FT SIM scan mass width high</i>	5
<i>neutral loss mass width</i>	1
<i>product mass width</i>	1

Die Peptid-Identifizierung erfolgte mithilfe des Programms Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific) und des Sequest-Algorithmus. Dazu erfolgte der Abgleich der Daten im raw-Fileformat entweder mit der gesamten SwissProt-Proteindatenbank oder ausschließlich mit HIV-Sequenzen im fasta-Fileformat. Die Software-Einstellungen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Programmeinstellungen „Proteome Discoverer“**

Programmeinstellungen „Proteome Discoverer“	
Precursor-Auswahl	MS <sup>1</sup>
Massenbereich der Precursor	350-5000 Da
TopN	20
<i>mass window</i>	100 Da
Enzym	Trypsin
max. Anzahl der Fehlsplattungen ( <i>missed cleavages</i> )	3-6
Massentoleranz der Precursor-Ionen	10 ppm
Massentoleranz der Fragmentionen	0,8 Da
Stetige Modifikationen	carbamidomethyliertes Cystein
Variable Modifikationen	keine
Ziel-FDR ( <i>strict</i> )	0,01
Ziel-FDR ( <i>relaxed</i> )	0,05

#### 3.6.4. Analyse intakter Proteine

Die Messung intakter Proteine erfolgte mit den kommerziell hergestellten rekombinanten Proteinen, die mit der Spritzenpumpe direkt in das Massenspektrometer injiziert wurden. Die Messung erfolgte in der Linearen Ionenfalle im Full-Scan im Bereich von  $m/z$  300-2000 in einer Zeit von 0-2 min. Die Dekonvolution der Massenspektren erfolgte mit einem integrierten Programm-Modul von XCalibur.

### 3.7. Quantitative Aminosäureanalytik von Referenzmaterialien

Mithilfe der Aminosäureanalytik können die Stoffmengenkonzentrationen in nmol/g von Peptiden und Proteinen aufgrund des Konzepts der doppelten Isotopenverdünnung sehr genau bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde sie für die Bestimmung der natürlichen HIV-Quantifizierungsstandards (Peptide und Proteine) eingesetzt und wurde freundlicherweise von Herrn Rüdiger Ohlendorf durchgeführt.

Für eine exakte Quantifizierung einer Peptid- oder Proteinlösung ist vor allem eine hohe Reinheit bezüglich fremder aminosäure-haltiger Moleküle sehr wichtig. Deshalb wurden die Synthesen aller Peptide und Proteine mit der höchst-möglichen Reinheit in Auftrag gegeben. Demnach wurden alle Peptide kommerziell über Flüssigkeitschromatographie und Proteine über Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinheit aller Substanzen wurde zusätzlich mit einer LC-MS-Analyse überprüft. Da die Chromatogramme und Massenspektren keine relevanten Verunreinigungen aufzeigten, wurde auf eine zusätzliche Aufreinigung verzichtet. Auch die Löslichkeit und Stabilität der Peptide oder Proteine in der Ursprungslösung ist für einen stabilen quantitativen Wert ausschlaggebend, da ein Ausfallen oder Aggregieren der Moleküle die mittels Aminosäureanalytik bestimmte Konzentration verändern würde. Die Löslichkeit von Peptiden und Proteinen wurde ausschließlich visuell anhand der Trübung überprüft. Die Peptid- und Proteinlösungen zeigten stets eine klare Lösung und ausgeflockte Bestandteile waren nicht zu erkennen. Während der intensiven Nutzung der Materialien für unterschiedliche Anwendungen wurden keine Veränderungen in den Konzentrationen festgestellt. Das bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Hydrolyse-Protokoll beruht auf der sauren Hydrolyse mit Salzsäure (6 M) bei 150 °C für 60 h<sup>151</sup>. Unter diesen sauren Bedingungen werden Aminosäureketten vollständig hydrolysiert. Da vor allem die fünf Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Prolin, Valin und Phenylalanin chemisch stabil bleiben, wurden ausschließlich diese Aminosäuren für die Stoffmengenbestimmung von Peptiden und Proteinen in Betracht gezogen. Die verwendeten natürlichen Aminosäuren als zertifizierte Referenzmaterialien und die entsprechenden isotoopenmarkierten Formen sind in Tabelle 23 (siehe Anhang, Seite 124) aufgelistet.

Der Stoffmengengehalt der Peptid- oder Proteinlösung wurde zunächst in einem Vorversuch abgeschätzt, um dann für eine Dreifach-Bestimmung des Konzentrationsgehalts das Prinzip der „*exact-matching*-Methode“ der doppelten Isotopenverdünnung anwenden zu können<sup>134,152,153</sup>. Mit diesem Methodenprinzip werden alle Verzerrungen (*bias*), die z.B. durch unvollständige Isotopenanreicherung in den markierten Aminosäuren verursacht werden, korrigiert. Die Herstellung der Lösung des Referenzmaterials (natürliche Aminosäure) und der Lösung des isotoopenmarkierten Materials (Aminosäure-Spike) ist auf Seite 130 (siehe Anhang,

Absatz „Puffer und Lösungen“) beschrieben. Für die Kalibrierung der Messung wurde eine Vergleichslösung bestehend aus der Referenzmaterial-Lösung und der Aminosäure-Spikelösung hergestellt. Dazu wurden 5-50 mg (5-50  $\mu$ L) der Lösungen unter Wägung in ein 1,5 mL Autosampler-Fläschchen im Verhältnis 1:1 dosiert. Für die Herstellung der Probenlösung (Peptid- oder Proteinprobe + Aminosäure-Spikelösung) wurde genauso verfahren wie bei der Herstellung der Vergleichslösung unter Dosierung der Peptid- oder Proteinprobe. Probenlösung und Vergleichslösung (jeweils etwa 50-150  $\mu$ L) wurden anschließend gleichermaßen für die Aminosäureanalytik vorbereitet. Dazu wurden die präparierten Lösungen in Vakuum-Hydrolyse-Röhrchen (6 mL, 10 mm x 150 mm) überführt und in einer Vakuum-zentrifuge bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurden 400  $\mu$ L Salzsäure (6 M) mit 0,1 % Phenol hinzugegeben. Mithilfe eines Vakuum-Pumpstands TSD 020 und flüssigem Stickstoff wurden die Röhrchen evakuiert. Nach Abkühlen der Röhrchen auf Raumtemperatur wurde die Hydrolyse für 60 h im Metallblock-Thermostat bei 150 °C durchgeführt. Für die anschließende Analyse wurden die Lösungen mit einer langen Pasteur-Pipette in Autosampler-Fläschchen überführt, mit Stickstoff bei 108 °C auf dem Heizblock bis zur Trockne eingedampft und in 1 mL 80 % Acetonitril gelöst. Die Proben wurden anschließend an einem LC-gekoppelten ESI-Quadrupol-Massenspektrometer (Agilent 1100 LC/MSD-Gerätesystem) analysiert. Die chromatographische Trennung der Aminosäuren erfolgte mit einer ZIC-HILIC-Säule (3,5  $\mu$ m; 150 mm x 2,1 mm) mit entsprechender HPLC-Vorsäule (ZIC-HILIC Optiguard; 5  $\mu$ m, 10 mm x 1 mm) und einer mobilen Phase bestehend aus Eluent A Ammoniumacetat (5 mM) in Wasser und Eluent B Acetonitril (100 %). Nach ausreichender Equilibrierung der Säule bei 80 % B, erfolgte der Gradient 80-40 % B in 15 min bei einer Flussrate von 0,1 mL/min. Die massenspektrometrische Messung der Aminosäuren erfolgte hochauflösend und im SIM-Modus. Für die Bestimmung der Intensitätsverhältnisse zwischen natürlichen und markierten Aminosäuren wurden unter Anwendung des Software-Moduls „Data Analysis, Integrate“ folgende SIM-Ionenspuren extrahiert:  $m/z$  116,1/122,1 (Prolin),  $m/z$  118,1/124,1 (Valin),  $m/z$  132,1/138,1 (Leucin und Isoleucin) und  $m/z$  166,1/176,1 (Phenylalanin).

### 3.8. Ermittlung der Messunsicherheit nach dem GUM

Das Ergebnis von quantitativen Messungen ist erst mit einer Angabe einer Messunsicherheit aussagekräftig, da Messergebnisse von verschiedenen Fehlerquellen beeinflusst werden<sup>154</sup>. Demnach sollte ein Ergebnis einer Messgröße  $Y$  durch den Messwert bzw. Ausgangsgröße  $y$  und eine dazugehörige Messunsicherheit angegeben werden, die sich aus den Messunsicherheiten der einzelnen Eingangsgrößen  $x_i$  zusammensetzt<sup>155</sup>. Der GUM (*Evaluation of Measurement Data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*) beschreibt diesbezüglich Regeln für die Bestimmung der Messunsicherheit der Ausgangsgröße  $y$  aus den Messunsicherheiten der Eingangsgrößen  $x_i$ <sup>155</sup>. In dieser Arbeit wurde die Messunsicherheit mit Hilfe der Software „GUM Workbench Professional 2.4.“ bestimmt, die nach den Regeln des GUMs arbeitet. Die Prinzipien werden nachfolgend kurz erläutert.

Der erste Schritt ist, eine Modellgleichung zu erstellen, die die Abhängigkeit von der Ausgangsgröße  $y$  zu allen Eingangsgrößen  $x_i$  beschreibt:

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_i)$$

Im zweiten Schritt folgt die bestmögliche Bestimmung der Werte und assoziierten Messunsicherheiten der Eingangsgrößen  $x_i$ . Dabei wird zwischen zwei Arten von Messunsicherheiten unterschieden, die als Typ A und Typ B bezeichnet werden<sup>154,155</sup>. Typ A beschreibt zufällige statistische Fehler, die experimentell aus einer Messreihe mit  $n$  Messungen, dem Mittelwert  $\bar{x}$  und der Standardabweichung  $s$  bestimmt werden<sup>155,156</sup>. Daraus ergibt sich die Standardabweichung des Mittelwerts:

$$u(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$u(\bar{x})$ : Standardabweichung des Mittelwerts  
 $s$ : Standardabweichung  
 $n$ : Anzahl der Messungen

Dagegen sind Typ B Unsicherheiten nicht statistisch. Informationen zu den Werten und Unsicherheiten können von Zertifikaten oder Spezifikationen vom Hersteller übernommen werden<sup>154</sup>. Weiterhin erfolgt die Einteilung der verschiedenen Eingangsgrößen nach deren Wahrscheinlichkeitsverteilung, die durch ihre Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion bestimmt wird<sup>156</sup>. Während Typ-A Eingangsgrößen immer durch eine Normalverteilung beschrieben

werden, können für Typ B Eingangsgrößen verschiedene Verteilungen zutreffen z.B. Normalverteilung, Rechteckverteilung oder Dreieckverteilung<sup>154,156</sup>.

Zudem wird ein Sensitivitätskoeffizient  $c_i$  bestimmt, der beschreibt, wie stark Änderungen der jeweiligen Eingangsgrößen Einfluss auf die Ausgangsgröße nehmen<sup>156</sup>. Die Beiträge aller Eingangsgrößen auf die Unsicherheit von  $y$  werden durch eine kombinierte Messunsicherheit von  $y$  beschrieben, die durch Fehlerfortpflanzung von nicht-korrelierenden Eingangsgrößen wie folgt kalkuliert wird<sup>155</sup>:

$$u^2(y) = \sum_i^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)$$

$u^2(y)$ : kombinierte Varianz der Ausgangsgröße  $y$

$u^2(x_i)$ : Varianz der verschiedenen Eingangsgrößen  $x_i$

$\partial y / \partial x_i$ : partielle Ableitung von  $y$  nach  $x_i$

Durch Multiplikation der kombinierten Messunsicherheit mit einem sogenannten Erweiterungsfaktor  $k$ , wird die erweiterte Messunsicherheit  $U$  berechnet<sup>154</sup>. Der Faktor  $k$  beschreibt dabei das Vertrauensniveau und beträgt bei einem Vertrauensintervall von 95 % in den meisten Fällen  $k = 2$ .<sup>155</sup>

$$U = k \cdot u(y)$$

$U$ : erweiterte Messunsicherheit

$k$ : Erweiterungsfaktor

$u(y)$ : kombinierte Messunsicherheit der Ausgangsgröße

Das Ergebnis der Messgröße  $Y$  aus Ausgangsgröße  $y$  und deren erweiterten Messunsicherheit  $U$  wird wie folgt angegeben:

$$Y = y \pm U$$





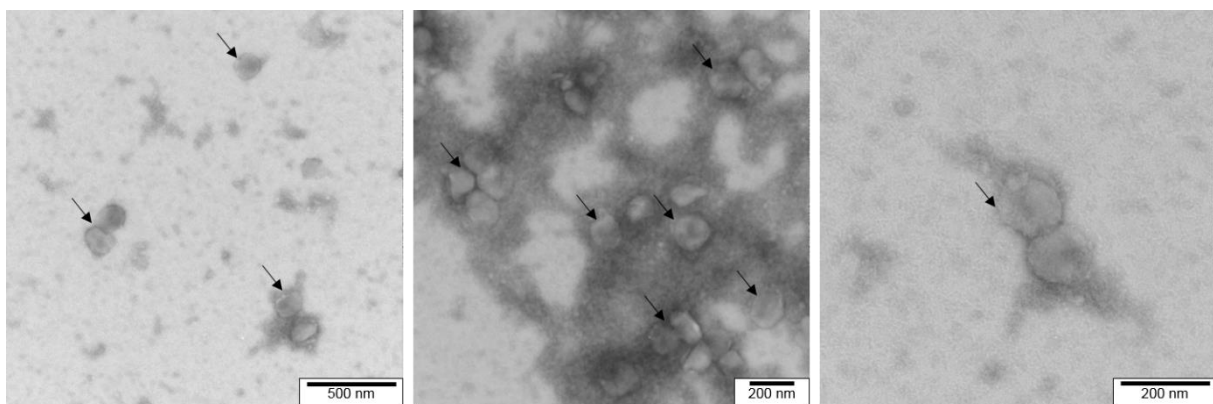
## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Charakterisierung des Virusmaterials

Das für alle Experimente benötigte HIV-Material wurde durch Virusexpansion in Zellkultur hergestellt. Um einen Eindruck von der Proben-Beschaffenheit und Viruspartikeln zu erhalten, wurde das Probenmaterial mit der Elektronenmikroskopie (EM) analysiert. Das Proteinprofil wurde mithilfe von Peptide-Mapping-Analysen untersucht, um speziell die Komplexität der Probenmatrix zu untersuchen und um zu analysieren, welche HIV-Proteine bzw. -Peptide in die quantitative Methodenentwicklung einbezogen werden können.

#### 4.1.1. Elektronenmikroskopische Analyse

Das für die Experimente verwendete Virusmaterial wurde bezüglich der Qualität mit der EM in der Negativ-Kontrastierung analysiert. Die EM-Aufnahmen sind in Abbildung 10 gezeigt.



**Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des HIV-Probenmaterials.**

Analyse des negativ-kontrastierten HIV-Materials (mittels 2%iger Uranylacetat-Lösung) und Analyse am Zeiss TEM910. Die Abbildung zeigt Partikelstrukturen (Pfeile) die in einer Protein-Matrix höherer Dichte (dunkel gefärbter Hintergrund) liegen.

Die abgebildeten Partikelstrukturen (schwarze Pfeile) haben einen durchschnittlichen Durchmesser von  $152,37 \text{ nm} \pm 10,94 \text{ nm}$  ( $n=10$ ). Da die Partikelgrößen alle relativ ähnlich sind und einem typischen HIV-Partikeldurchmesser von 120-160 nm<sup>64,64,157</sup> entsprechen, handelt es sich vermutlich um HIV-Partikel und nicht um ähnlich aufgebaute Exosomen, die in ihrer Größe stärker variieren (Durchmesser von 30-120 nm)<sup>158</sup>. Diese Vermutung wird auch durch die Ergebnisse des Infektionsassays (TCID<sub>50</sub>) gestützt (siehe Abschnitt 3.1.6, Seite 29). Das

Virusmaterial weist auch nach der Ultrazentrifugation einen hohen infektiösen Titer auf, was bedeutet, dass die Viruspartikel auch nach der Probenaufbereitung weitestgehend intakt bleiben. Auffällig sind die dunkel gefärbten Bereiche in Abbildung 10, in denen meist auch die Partikelstrukturen liegen. Diese sind charakteristisch für freiliegende Proteinmoleküle (Manfred Rohde<sup>159</sup>) und können zum einen Serumproteine aus dem Kulturmedium und/oder zelluläre Proteine aus der Jurkat-T-Zelllinie sein, die für die Virusexpansion verwendet wurde. Anhand der Aufnahmen und der abgebildeten Proteinkomplexe ist zu erkennen, dass die für die EM präparierten Proben eher inhomogene Eigenschaften aufzeigen. Das liegt vor allem daran, dass das Viruspellet direkt mit der Fixierlösung resuspendiert wurde, was zu einer direkten Fixierung der pelletierten Partikel- und Proteinkomplexe führt. Zudem wurde das Viruspellet nur leicht in der Fixierlösung resuspendiert, um die Partikelstrukturen intakt zu erhalten. Da es für quantitative Messungen wichtig ist, homogenes Probenmaterial zu verwenden, wurde dafür das Viruspellet sorgfältig in 5 mL PBS-Puffer für 30 min bei 150 rpm und 4 °C auf einem Flachsüttler homogenisiert.

### 4.1.2. Analyse des Proteinprofils

Das Proteinprofil der präparierten HIV-Proben wurde mithilfe von Peptide-Mapping-Analysen untersucht (siehe Abschnitt 3.6.3, Seite 44). Die Daten wurden gegen alle Proteinsequenzen aus der Swiss-Prot-Datenbank der UniProtKB-Proteindatenbank (vom 31.05.2017) abgeglichen. Die identifizierten Proteingruppen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Aus HIV wurden 57,4 % der Gag-Polyprotein (GAGp55)-Sequenz eindeutig nachgewiesen. Zudem wurden verschiedene Serumproteine wie Albumin, die aus dem Rinderserum des zur Virusexpansion eingesetzten Zellkulturmediums stammen, eindeutig identifiziert. Demnach ist es wahrscheinlich, dass der Großteil der extrazellulären bzw. freien Proteinmoleküle in den EM-Aufnahmen (Abbildung 10) dem Serummaterial entspricht. Identifizierte Proteine humanen Ursprungs sind die beiden Histone H2A und H2B, die mit den anderen Histon-Typen das Chromatin im Zellkern ausbilden. Histone sind sehr abundante zelluläre Proteine, weshalb sie auch mit der Peptide-Mapping-Methode eindeutig nachgewiesen werden konnten. Da sie normalerweise ausschließlich im Zellkern der Zellen lokalisiert sind, deutet ihr Nachweis darauf hin, dass auch weitere intrazelluläre Proteine durch das Absterben der Zellen während der Virusexpansion in der Probenmatrix existieren. Demnach können theoretisch die detektierten HIV-Proteine sowohl aus den Viruspartikeln, als auch aus den Zellen stammen, die für die Virusproduktion das nötige Virusmaterial exprimieren.

Tabelle 5: Proteinprofil der präparierten HIV-Proben

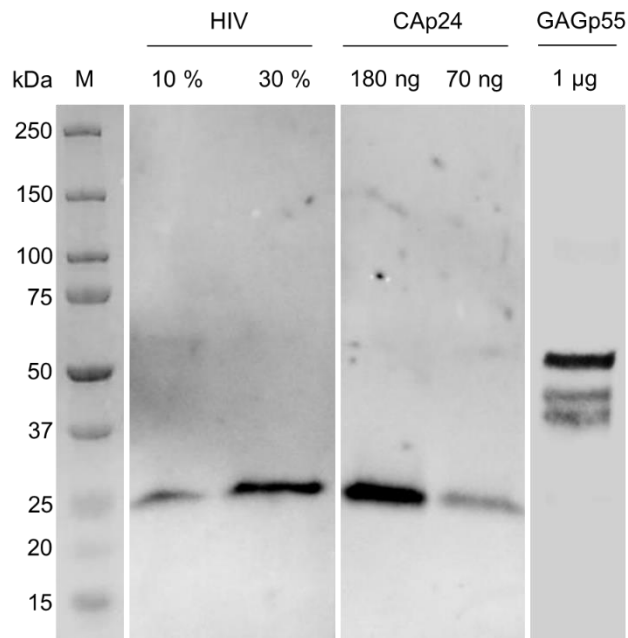
Organismus	Ursprung	Protein (Acc.-Nr.)	Protein-Identifizierung [%]
<i>Bos Taurus</i>	Serum (Zellkultur)	Albumin (P02769)	72,2
		Serotransferrin (Q29443)	6,8
		Fetuin A (P12763)	34,3
		Fetuin B (Q58D62)	13,2
		Hämoglobin (P02070)	17,2
		Transthyretin (O46375)	32,0
		Apolipoprotein A-II (P81644)	16,0
HIV-1	HIV-Laborstamm	Gag (P03348)	57,4
<i>Homo sapiens</i>	Jurkat-Zelllinie	Histon H2A Typ 1 (Q86KK5)	38,3
		Histon H2B Typ 1 (O60814)	35,7

Insgesamt reicht eine einstufige Ultrazentrifugation über ein 15%iges Saccharose-Kissen nicht aus, um Viruspartikel von Matrixproteinen abzutrennen. Trotzdem wurde das so präparierte Virusmaterial für alle Experimente eingesetzt, da es einer natürlichen Probe z.B. von einem Patienten mit den entsprechenden Matrixkomponenten ähnlich ist.

Für Analysen an reinen Viruspartikeln muss die Reinigungsstrategie in weiterführenden Arbeiten weiterentwickelt und optimiert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, ein höher prozentiges Saccharose-Kissen (30 %) einzusetzen<sup>158</sup>. Die Dichte der 30%igen Saccharose ist mit 1,12-1,18 g/mL äquivalent zu der Dichte der Exosomen 1,15-1,19 g/mL, wodurch die Exosomen schonend darin sedimentieren und Protein-Kontaminationen höherer Dichte (1,22 g/mL) abgetrennt werden<sup>158,160</sup>. Da HIV-Partikel mit einer Dichte von ~1,14-1,16 g/mL<sup>161</sup> auch im Bereich der Exosomen liegen, könnte diese Reinigungsstrategie auch für HIV-Partikel funktionieren. Ein zusätzlicher Reinigungseffekt kann durch eine anschließende Dichtegradienten-Ultrazentrifugation erreicht werden.

In der Viruspräparation konnten vor allem die viralen Strukturproteine, die aus dem Proteinvorläufer GAGp55 stammen, eindeutig nachgewiesen werden, da das Gag-Polyprotein das am häufigsten vorkommende HIV-Protein ist (siehe Tabelle 5). Die Sequenzbereiche zwischen den einzelnen Strukturproteinen aus GAGp55, die die Schnittstellen der viralen Protease enthalten, sind charakteristisch für das intakte nicht-enzymatisch prozessierte Gag-Polyprotein, welches in unreifen Viruspartikeln vorkommt. Tryptische Peptide, die zwei aneinander liegende Strukturproteine aus GAGp55 überlappen und entsprechend eine Protease-Schnittstelle enthalten, konnten in den Peptide-Mapping-Analysen nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass der Großteil des Gag-Polyproteins enzymatisch prozessiert vorliegt und auch

die Viruspartikel vorwiegend im reifen Zustand sind. Das bestätigt auch die Western-Blot-Analyse des Virusmaterials in Abbildung 11, da mit dem Capsid-spezifischen Antikörper ausschließlich das einzelne CAP24 bei 26 kDa und nicht das CAP24-enthaltende GAGp55 bei 56 kDa identifiziert werden konnte.



**Abbildung 11: Western-Blot-Analyse von HIV-Proben.**

10 % und 30 % einer aufkonzentrierten Probe aus ursprünglich 20 mL Virussuspension wurden analysiert. Als Positivkontrollen wurden 180 ng und 70 ng rekombinantes Capsidprotein (CAP24) und 1 µg rekombinantes Gag-Polypeptid (GAGp55) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem CAP24-spezifischen Antikörper. Als Größenstandard (M) wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standard verwendet.

Um auch die *N*- und *C*-terminalen Sequenzbereiche der einzelnen Strukturproteineinheiten identifizieren zu können, wurden die Messdaten zusätzlich gegen die einzelnen HIV-Strukturproteinsequenzen Matrix bis p6 analysiert. Abbildung 12 zeigt das Gesamtergebnis der identifizierten Sequenzbereiche der Strukturproteine anhand der GAGp55-Sequenz. Insgesamt wurden 57,4 % der GAGp55-Proteinsequenz eindeutig identifiziert.

10	20	30	40	50
MGARASVLSG	GELDRWEKIR	LRPGGKKKYK	LKHIVWASRE	LERFAVNPGI
60	70	80	90	100
LETSEGCQRQI	LGQLQPSLQT	GSEELRSLYN	TVATLYCVHQ	RIEIKDTKEA
110	120	130	140	150
LDKIEEEQNK	SKKKAQQAAA	DTGHSNQVSQ	NYPIVQNIQG	QMVHQAI SPR
160	170	180	190	200
TLNAWVKVVE	EKAFSPEVIP	MFSALSEGAT	PQDLNMTLNT	VGGHQAAQM
210	220	230	240	250
LKETINEEAA	EWDRVHPVHA	GPIAPGQMRE	PRGSDIAGTT	STLQEQIGWM
260	270	280	290	300
TNNPPIPVGE	IYKRWIILGL	NKIVRMYSP	SILDIRQGPK	EPFRDYVDRF
310	320	330	340	350
YKTLRAEQAS	QEVKNWMTET	LLVQNANPDC	KTILKALGPA	ATLEEMMTAC
360	370	380	390	400
QGVGGPGHKA	RVLAEAMSQV	TNSATIMMQR	GNFRNQKIV	KCFNCGKEGH
410	420	430	440	450
TARNCRAPRK	KGCWKCCKEG	HQMKDCTERQ	ANFLGKIWPS	YKGRPGNFIQ
460	470	480	490	500
SRPEPTAPPE	ESFRSGVETT	TPPQKQEPID	KELYPLTSLR	SLFGNDPSSQ

**Abbildung 12: Sequenzabdeckung von GAGp55 in HIV-Proben.**

GAGp55-Sequenz mit einzelnen Bereichen der Strukturproteine: Matrix (1-132), Capsid (133-363), Spacer 1 (364-377), Nukleocapsid (378-432), Spacer 2 (433-448) und p6 (449-500). Die grau hinterlegten Sequenz-Abschnitte wurden eindeutig mittels Peptide-Mapping identifiziert.

Die Sequenz vom Matrixprotein konnte zu 73,3 % nachgewiesen werden, vom Capsidprotein zu 64,5 %, das Nukleocapsid zu 50,9 %, Spacer 2 vollständig und von p6 ausschließlich das C-terminale Peptid (19,2 %). Spacer 1 konnte nicht nachgewiesen werden. Durch den Einsatz von relativ geringen Mengen an Proteomics-Grade Trypsin von 20 µg verläuft die Proteolyse einer komplexen biologischen HIV-Probe nicht vollständig und es entstehen neben vollständig gespaltenen Peptiden zusätzlich Peptide mit nicht-gespaltenen Schnittstellen (*missed cleavages*). Für Proteomics-Studien hat dies den Vorteil, dass ein weiter Sequenzbereich auch durch Sequenzüberlappungen eindeutig identifiziert werden kann. Ein vollständiger Sequenznachweis eines Proteins in biologischen Proben durch die Anwendung eines Messverfahrens ist dennoch meist nicht möglich. So können vollständig gespaltene Peptide zu klein ausfallen und auch mehrere aufeinanderfolgende Arginin- und Lysin-Reste führen zu keinen einheitlichen Peptid-Bruchstücken. Ein gutes Beispiel hierfür zeigt der Sequenzbereich im Matrixprotein zwischen Aminosäure (*amino acid, aa*) 21 und 30 und im Capsidprotein zwischen 286-305 (siehe Abbildung 12). Auch die Detektion von sehr langen Peptiden wie zum Beispiel das 52-Aminosäure lange Capsid-Peptid (aa 163-234) ist mit der hier verwendeten Methodik nicht möglich. Manche Aminosäuren können auch posttranslational modifiziert vorliegen, welche dann nur durch eine gezielte Suche identifiziert werden können. Die Modifikationen von HIV-Proteinen werden von den Zellen eingeführt und können wichtige biologische Funktionen bewirken. Zum Beispiel ist bekannt, dass das N-terminale Glycin (aa 2 in Abbildung 12) myristoyliert vorliegt, um das Gag-Polypolprotein in der Lipidmembran

verankern zu können. Weiterhin konnten bereits in anderen Studien Phosphorylierungen an einigen Serin- und Threonin-Gruppen<sup>162–167</sup>, Methylierungen an Arginin-Gruppen<sup>167,168</sup> und Ubiquitinierungen an Lysin-Gruppen<sup>169,170</sup> im Gag-Polypeptid identifiziert werden. Peptide mit solchen biologischen Modifikationen sollten grundsätzlich in der reinen absoluten Protein-Quantifizierung ausgeschlossen werden, da dies zu falschen quantitativen Ergebnissen führen kann, sobald der verwendete Quantifizierungsstandard sich hinsichtlich der Modifikationen unterscheidet. In Tabelle 6 sind alle identifizierten Peptide von GAGp55 aus einer realen HIV-Probe aufgelistet. Diese empirische Analyse liefert einen guten Überblick darüber, welche Peptide überhaupt in den HIV-Proben nachweisbar sind und welche u.a. gute Ionisierungseffizienzen aufzeigen und potenziell für die Quantifizierung geeignet sind.

**Tabelle 6: Peptide-Mapping von GAGp55 in HIV-Probe**

Peptidsequenz	Protein	<i>m/z</i>	Aminosäure-Positionen <sup>1</sup>	<i>missed cleavages</i>
ASVLSGGELDRWEKIR	MAp17	605,995 <sup>+3</sup>	5-20	2
ASVLSGGELDRWEK	MAp17	773,897 <sup>+2</sup>	5-18	1
LKHIVWASRELER	MAp17	409,987 <sup>+4</sup>	31-43	2
LKHIVWASR	MAp17	370,557 <sup>+3</sup>	31-39	1
HIVWASRELER	MAp17	465,921 <sup>+3</sup>	33-43	1
HIVWASR	MAp17	434,743 <sup>+2</sup>	33-39	0
FAVNPGLLETSEGC*RQILGQLQPSLQ TGSEELR	MAp17	1209,952 <sup>+3</sup>	44-76	1
FAVNPGLLETSEGC*R	MAp17	825,401 <sup>+2</sup>	44-58	0
QILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATL YC*VHQR	MAp17	951,494 <sup>+4</sup>	59-91	1
SLYNTVATLYC*VHQR	MAp17	912,957 <sup>+2</sup>	77-91	0
IEIKDTK	MAp17	423,750 <sup>+2</sup>	92-98	1
PIVQNIQGQMVHQAI SPRTLNAWVKV VEEK	CAP24	683,376 <sup>+5</sup>	133-162	2
PIVQNIQGQMVHQAI SPRTLNAWVK	CAP24	707,889 <sup>+4</sup>	133-157	1
PIVQNIQGQMVHQAI SPR	CAP24	1008,544 <sup>+2</sup>	133-150	0
TLNAWVKVVEEK	CAP24	708,398 <sup>+2</sup>	151-162	1
TLNAWVK	CAP24	416,240 <sup>+2</sup>	151-157	0
GSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPIPV GEIYKRWIILGLNKIVR	CAP24	1195,647 <sup>+4</sup>	233-275	3
GSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPIPV GEIYKR	CAP24	1158,584 <sup>+3</sup>	233-264	1
RWIILGLNK	CAP24	556,851 <sup>+2</sup>	264-272	1
WIILGLNK	CAP24	478,800 <sup>+2</sup>	265-272	0
WIILGLNKIVR	CAP24	662,927 <sup>+2</sup>	265-275	1

MYSPTSILDIR	Cp24	648,337 <sup>+2</sup>	276-286	0
QGP	Cp24	215,126 <sup>+2</sup>	287-290	0
TLRAEQASQEVKNWMTETLLVQAN PDC*KTILK	Cp24	766,797 <sup>+5</sup>	303-335	3
AEQASQEVKNWMTETLLVQANPDC KTILK	Cp24	865,687 <sup>+4</sup>	306-335	2
TILKALGPAATLEEMMTAC*QGVGGP GHKARVL	Cp24	613,920 <sup>+5</sup>	332-361	2
TILKALGPAATLEEMMTAC*QGVGGP GHK	Cp24	710,363 <sup>+4</sup>	332-359	1
ALGPAATLEEMMTAC*QGVGGPGHK ARVL	Cp24	706,358 <sup>+4</sup>	336-363	2
ALGPAATLEEMMTAC*QGVGGPGHK AR	Cp24	653,320 <sup>+4</sup>	336-359	1
MQRGNFRNQRK	NCp7	478,921 <sup>+3</sup>	378-388	3
MQRGNFRNQR	NCp7	436,223 <sup>+3</sup>	378-387	2
MQRGNFR	NCp7	303,489 <sup>+3</sup>	378-384	1
GNFRNQR	NCp7	297,823 <sup>+3</sup>	381-387	1
CGKEGHQMKDCTERQAN	NCp7	512,973 <sup>+4</sup>	416-432	3
CGKEGHQMKDCTER	NCp7	434,688 <sup>+4</sup>	416-429	2
FLGKIWPSYKGRPGNF	Sp2	623,005 <sup>+3</sup>	433-448	2
SLFGNDPSSQ	p6	526,238 <sup>+2</sup>	491-500	0

\*carbamidomethyliertes Cystein

<sup>1</sup>GAGp55-Sequenz (P04591, Bereich von 1-500, UniProtKB)

Ziel ist es, ein weites Spektrum vom HIV-Gag-Polypeptid und bestenfalls jedes einzelne Strukturprotein daraus zu quantifizieren, um gegebenenfalls Unterschiede in der Protein-Stöchiometrie untersuchen zu können. Demzufolge wurden verschiedene Referenzmaterialien auf deren Eignung zur HIV-Quantifizierung getestet und validiert und darauf basierend zusammen mit den Proteomics-Analysen quantitative Peptide ausgewählt. Diese Aspekte werden in den nächsten Kapiteln näher beleuchtet.

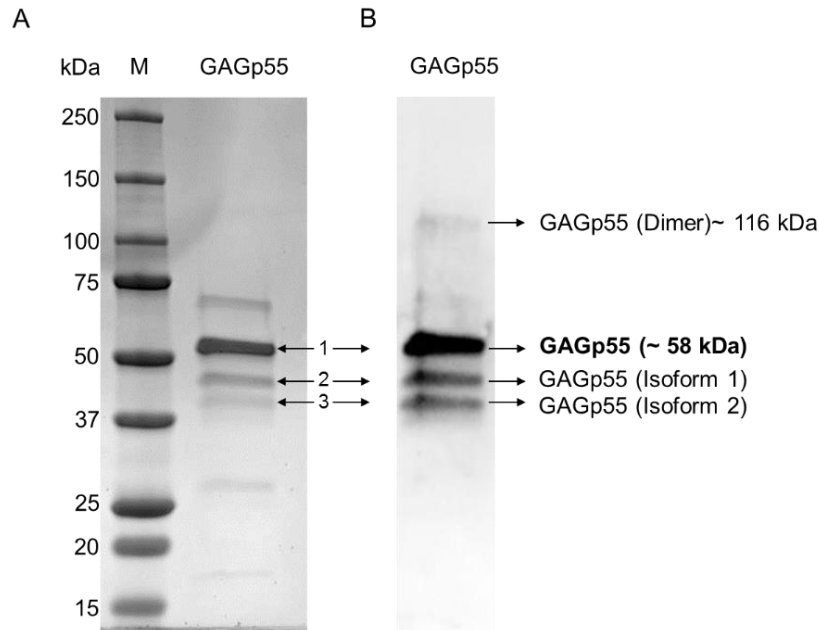
## 4.2. Validierung von HIV-Protein-Referenzmaterialien

Für die Quantifizierung der Proteinanteile im HIV-Gag-Polyprotein werden isotoopenmarkierte Spikematerialien benötigt. Für die Anwendung der doppelten Isotopenverdünnung werden entsprechende natürliche Referenzmaterialien hinzugezogen. Dazu wurde die rekombinante Synthese von verschiedenen HIV-Proteinen aus dem Gag-Polyprotein in natürlicher und teilweise in markierter Form in Auftrag gegeben. Dieses Kapitel beschreibt die Untersuchungen zur Reinheit und Eignung dieser Materialien zur HIV-Proteinquantifizierung.

### 4.2.1. Gag-Polyprotein

Da das Gag-Polyprotein (GAGp55), das alle Strukturprotein-Untereinheiten abdeckt und somit auch alle potenziellen quantotypischen Peptide zur Quantifizierung von HIV enthält, in den ersten Analysen der HIV-Proben eindeutig nachgewiesen wurde, ist es ein vielversprechender Kandidat für ein Referenzmaterial. Es wurde von der Firma Trenzyme in natürlicher Form rekombinant mit einem *N*-terminalen Histidin-Tag und einschließlich einer Protease-Schnittstelle (Motiv: MGH<sub>9</sub>-ENLYFQGG) in *E. coli* hergestellt (siehe Tabelle 25, Seite 126). Der His-Tag dient zur Isolierung und Reinigung des Produkts von anderen bakteriellen Proteinen, die bei der rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* entstehen. Die Reinigung erfolgte über eine Affinitätschromatographie vom Hersteller. Auf eine Tag-Entfernung durch enzymatische Abspaltung wurde in der Annahme verzichtet, dass keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der biophysikalischen Eigenschaften des Proteins auftreten, und um das bestehende Risiko der Verschlechterung der Löslichkeit des Proteins zu minimieren. Da die Proteinausbeute und -reinheit sehr gering war und Western-Blot-Analysen mithilfe eines His-Tag-spezifischen Antikörpers der Firma Trenzyme neben dem Gag-Polyprotein-Hauptprodukt (~ 58 kDa) zusätzliche kleinere produktspezifische Banden aufzeigten, wurde die Synthese angelehnt an das Protokoll von McKinstry *et al.*<sup>171</sup> von der Firma wiederholt. Um einen enzymatischen Abbau des Gag-Polyproteins auszuschließen, wurden zusätzlich erhöhte Mengen an Protease-Inhibitor in allen Synthese- und Reinigungsschritten eingesetzt. Mit dem optimierten Synthese- und Reinigungsprotokoll konnte eine höhere Ausbeute und Reinheit bzgl. der Abtrennung von bakteriellen Proteinen erzielt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Qualität des rekombinant hergestellten GAGp55-Proteins wurde die Probe in dieser Arbeit mittels SDS-PAGE und zusätzlich mit einem CAp24-spezifischen Antikörper im Western-Blot analysiert (siehe Abbildung 13).





**Abbildung 13: SDS-PAGE und Western-Blot von rekombinantem GAGp55-Protein**

1 µg GAGp55-Probe wurden mittels SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B) analysiert. Die spezifische Detektion von GAGp55 erfolgte mit einem CAP24-spezifischen Antikörper (B). Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standard verwendet.

Die SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 13/A) zeigt, dass trotz des optimierten Synthese- und Reinigungsprotokolls von GAGp55 weitere Proteine nachgewiesen werden konnten, wobei drei dieser Banden (Banden 1-3) im Western-Blot als GAGp55-spezifisch identifiziert worden sind (Abbildung 13/A-B). Die erste GAGp55-spezifische Bande (Bande 1) scheint dabei das vollständige His-GAGp55-Protein mit einer Größe von 58 kDa zu entsprechen und die zwei unteren Banden (Bande 2 und 3) sind dagegen kleinere GAGp55-Proteinvarianten.

Um die Größen der GAGp55-Varianten besser abzuschätzen, wurde eine Molekulargewichtsanalyse mit dem „MW Analysis Tool“ der Software Image Lab 5.2.1 der Firma BioRad durchgeführt. Dafür wurde die GAGp55-Probe in drei separaten und unabhängigen Experimenten gelelektrophoretisch aufgetrennt und entsprechend das Molekulargewicht mit Standardabweichung der drei GAGp55-spezifischen Banden kalkuliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die durchschnittliche kalkulierte Molekülmasse der ersten GAGp55-Proteinbande mit  $58,2 \pm 0,7$  kDa entspricht nahezu der theoretischen Molekülmasse mit 58.261 Da, was die Vermutung stärkt, dass die erste GAGp55-Proteinbande dem vollständigen Protein entspricht. Die durchschnittliche kalkulierte Molekülmasse von Proteinvariante 1 und 2 entspricht  $49,1 \pm 0,2$  kDa und  $43,1 \pm 0,5$  kDa. Der prozentuale Anteil der GAGp55-Formen konnte auch anhand der Software-Analyse ermittelt werden und beträgt in etwa 60 % für 58 kDa und jeweils ~ 20 % für die kleineren Proteinvarianten 49 kDa und 43 kDa.

Tabelle 7: Kalkuliertes Molekulargewicht von GAGp55-Proteinformen mittels Gelanalyse

GAGp55- Formen	Molekulargewicht	prozentualer Anteil (%)
Bande 1 (Hauptprodukt)	58,2 ± 0,7 kDa	61,2
Bande 2 (Isoform 1)	49,1 ± 0,2 kDa	18,3
Bande 3 (Isoform 2)	43,1 ± 0,5 kDa	20,5

Um die Eigenschaften der unterschiedlich großen GAGp55-Formen zu untersuchen, wurde die Probe zusätzlich massenspektrometrisch analysiert, wobei eine direkte Analyse der Gag-Polyprotein-Probe weder über eine direkte Fließinjektion noch über eine vorherige chromatographische Trennung mittels RP-HPLC oder Größenausschlusschromatographie möglich war. Der Grund hierfür liegt in der Verwendung von Tween20 während der Proteinreinigung nach dem Protokoll von McKinstry *et al.*<sup>171</sup>. Tween 20 ist ein nichtionisches Tensid und gehört zu der Gruppe der ethoxylierten Polysorbate. Es wird häufig als Stabilisator vor allem für hydrophobe Proteine eingesetzt. Dies sollte jedoch für massenspektrometrische Analysen, wenn möglich vermieden werden, da bereits kleine Mengen die Ionisierung der Zielmoleküle unterdrücken. So werden auch die Massenspektren des GAGp55-Polyproteins von den typischen Spektren des Polysorbats (44 amu-Abfolgen) überlagert. Deshalb war eine massenspektrometrische Analyse der GAGp55-Probe ausschließlich über eine In-Gel-Proteolyse der bei der SDS-PAGE getrennten Proteinbanden möglich, da Tween20 als kleines Molekül zuerst aus dem Gel abgetrennt wird. Die aus dem Gel extrahierten tryptischen Peptide wurden anschließend über Peptide-Mapping-Analysen untersucht. Es konnte insgesamt eine Protein-Sequenzabdeckung von 76 % erzielt werden. Die identifizierten Peptidbruchstücke aus GAGp55 sind in *N*- zu *C*-terminaler Reihenfolge in Tabelle 8 aufgelistet, woraus ersichtlich wird, dass der Peptidanteil mit *missed cleavages* insgesamt sehr gering ausfällt: 71,9 % vollständig gespaltene Peptide; 25 % der Peptide mit einem *missed cleavage* und 3,1 % mit zwei *missed cleavages*. Da bekannt ist, dass Trypsin Schnittstellen mit *C*-terminal gelegenen Prolin nicht schneidet, wurde dieses Sequenzmotiv nicht als *missed cleavage* gewertet. Anhand Tabelle 8 wird deutlich, dass die Peptide mit *missed cleavages* typische Sequenzmotive aufzeigen, die für eine langsamere Proteolyse bekannt sind. Dazu gehören Trypsin-Schnittstellen mit umliegenden sauren Aminosäuren wie Glutaminsäure (E) und Asparaginsäure (D), kurz aufeinanderfolgende Lysin- und Arginin-Reste, sowie an den Enden kurze verbliebene Aminosäurereste, die durch das Trypsin nicht mehr so leicht weiter abgespalten werden können.

Tabelle 8: Peptide Mapping von rekombinantem GAGp55

Peptidsequenz	Protein	m/z	Aminosäure-Positionen <sup>1</sup>	missed cleavages
ASVLSGGELDRWEK	MAp17	773,897 <sup>+2</sup>	5-18	1
ASVLSGGELDR	MAp17	552,288 <sup>+2</sup>	5-15	0
<u>LK</u> HIVWASR	MAp17	370,557 <sup>+3</sup>	31-39	1
HIVWASR	MAp17	434,743 <sup>+2</sup>	33-39	0
FAVNPGLLETSEGC*R	MAp17	825,401 <sup>+2</sup>	44-58	0
QILGQLQPSLQTGSEELR	MAp17	999,037 <sup>+2</sup>	59-76	0
SLYNTVATLYC*VHQR	MAp17	912,957 <sup>+2</sup>	77-91	0
IEIKDTK	MAp17	423,750 <sup>+2</sup>	92-98	1
EALDKIEEEQNK	MAp17	723,360 <sup>+2</sup>	99-110	1
AQQAADTGHSNQVSQNY#PIVQNIQ GQMVHQAIAPR	MAp17-CAp24	972,480 <sup>+4</sup>	115-150	0
TLNAWVK	CAp24	416,240 <sup>+2</sup>	151-157	0
ETINEEAAEWDR	CAp24	731,826 <sup>+2</sup>	203-214	0
VHPVHAGPIAPGQMR	CAp24	522,949 <sup>+3</sup>	215-229	0
GSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPIPV GEIYKR	CAp24	1158,584 <sup>+3</sup>	233-264	1
RWILGLNK	CAp24	556,851 <sup>+2</sup>	264-272	1
WILGLNK	CAp24	478,800 <sup>+2</sup>	265-272	0
MYSPTSILDIR	CAp24	648,337 <sup>+2</sup>	276-286	0
EPFRDYVDR	CAp24	399,528 <sup>+3</sup>	291-299	1
DYVDR	CAp24	334,156 <sup>+2</sup>	295-299	0
AEQASQEVK	CAp24	495,248 <sup>+2</sup>	306-314	0
NWMTETLLVQNANPDC*K	CAp24	1017,474 <sup>+2</sup>	315-331	0
ALGPAATLEEMMTAC*QGVGGPGHK	CAp24	795,045 <sup>+3</sup>	336-359	0
VL#AEAMSQVTNSATIM#MQR	CAp24-Sp1-NCp7	1041,013 <sup>+3</sup>	362-380	0
C*FNC*GK	NCp7	393,157 <sup>+2</sup>	392-397	0
QAN#FLGK	NCp7-Sp2	389,216 <sup>+2</sup>	430-436	0
IWPSYK	Sp2	397,216 <sup>+2</sup>	437-442	0
GRPGNF#LQSRPEPTAPPEESFR	Sp2-p6	823,747 <sup>+3</sup>	443-464	0
SGVETTTTPPQKQEPIDKELYPLTSLR	p6	976,517 <sup>+3</sup>	465-490	2
SGVETTTTPPQK	p6	572,796 <sup>+2</sup>	465-475	0
QEPIDKELYPLTSLR	p6	901,488 <sup>+2</sup>	476-490	1
ELYPLTSLR	p6	546,308 <sup>+2</sup>	482-490	0
SLFGNDPSSQ	p6	526,238 <sup>+2</sup>	491-500	0

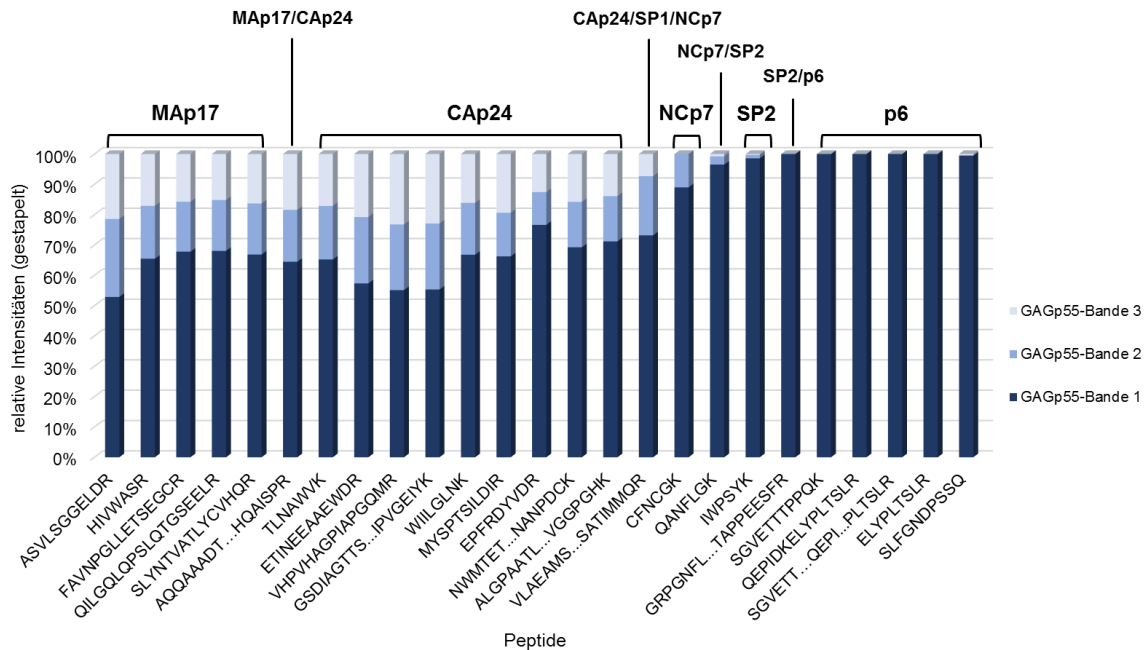
\*carbamidomethyliertes Cystein

#Schnittstelle der viralen Protease

<sup>1</sup>GAGp55-Sequenz (P04591, Bereich von 1-500, UniProtKB)

Die Protein-überlappenden Peptide mit der viralen Protease-Schnittstelle sind in HIV-Proben spezifisch für GAGp55, da es dann enzymatisch nicht prozessiert vorliegt. Diese Peptide konnten, wie erwartet, eindeutig in der rekombinanten GAGp55-Probe nachgewiesen werden. Dies unterstützt zusätzlich die Vermutung, dass GAGp55 in den realen HIV-Proben vollständig in die einzelnen Strukturproteinelemente prozessiert vorliegt (siehe Abschnitt 4.1.2 „Analyse des Proteinprofils“, Seite 52).

Diese massenspektrometrische Peptide-Mapping-Analyse wurde mit allen drei GAGp55-Proteinformen separat durchgeführt, um zu untersuchen, welche Aminosäuresequenzbereiche in den kleineren GAGp55-Proteinvarianten fehlen. Dazu wurden die drei im Gel aufgetrennten spezifischen GAGp55-Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und für die Proteolyse im Gel separat eingesetzt und datenabhängig analysiert. Die identifizierten Peptide aus der ersten GAGp55-Bande bei ca. 58 kDa decken das gesamte Gag-Polypeptid *N*- zu *C*-terminal ab. Da die Peakflächen dieser Peptide in einer Größenordnung liegen, wird angenommen, dass dieses Produkt auch das vollständige GAGp55 mit 58 kDa darstellt, so wie es auch anhand der Molekulargewichtsanalysen gezeigt wurde. Um die fehlenden Aminosäuresequenzbereiche der beiden kleineren GAGp55-Proteinvarianten zu untersuchen, wurden die einzelnen Peakflächen der HIV-Peptide aus jeder Gag-Proteinvariante relativ zur Summe der Peakflächen aus allen drei Formen in Bezug gesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 gezeigt. Das vollständige GAGp55 (Bande 1, dunkelblau) mit 58 kDa deckt das gesamte Protein *N*- zu *C*-terminal ab, wobei die Sequenzen der kleineren GAGp55-Proteinvarianten im *C*-terminalen Bereich des Proteins enden. In beiden Proteinvarianten 49 kDa und 43 kDa fehlt das *C*-terminale p6 vollständig. Die GAGp55-Proteinvariante mit ca. 49 kDa (Bande 2) endet innerhalb des Nukleocapsidproteins (NCp7) im *C*-terminalen Bereich und die 43 kDa-Proteinvariante (Bande 3) im *N*-terminalen Bereich von NCp7. Der durchschnittliche prozentuale Anteil der GAGp55-Formen kann anhand der *N*-terminalen Peptide, die in allen drei GAGp55-Formen existieren, abgeschätzt werden und entspricht in etwa dem Ergebnis aus der Molekulargewichtsanalyse mit ~60 % für die 58 kDa-Form und jeweils ~ 20 % für die kleineren Proteinvarianten 49 kDa und 43 kDa.



**Abbildung 14: Massenspektrometrische Charakterisierung von drei GAGp55-Formen**

Dargestellt sind die relativen Peakflächen der einzelnen N- zu C-terminal aufgeführten GAGp55-Peptide (x-Achse) aus drei verschiedenen GAGp55-Formen.

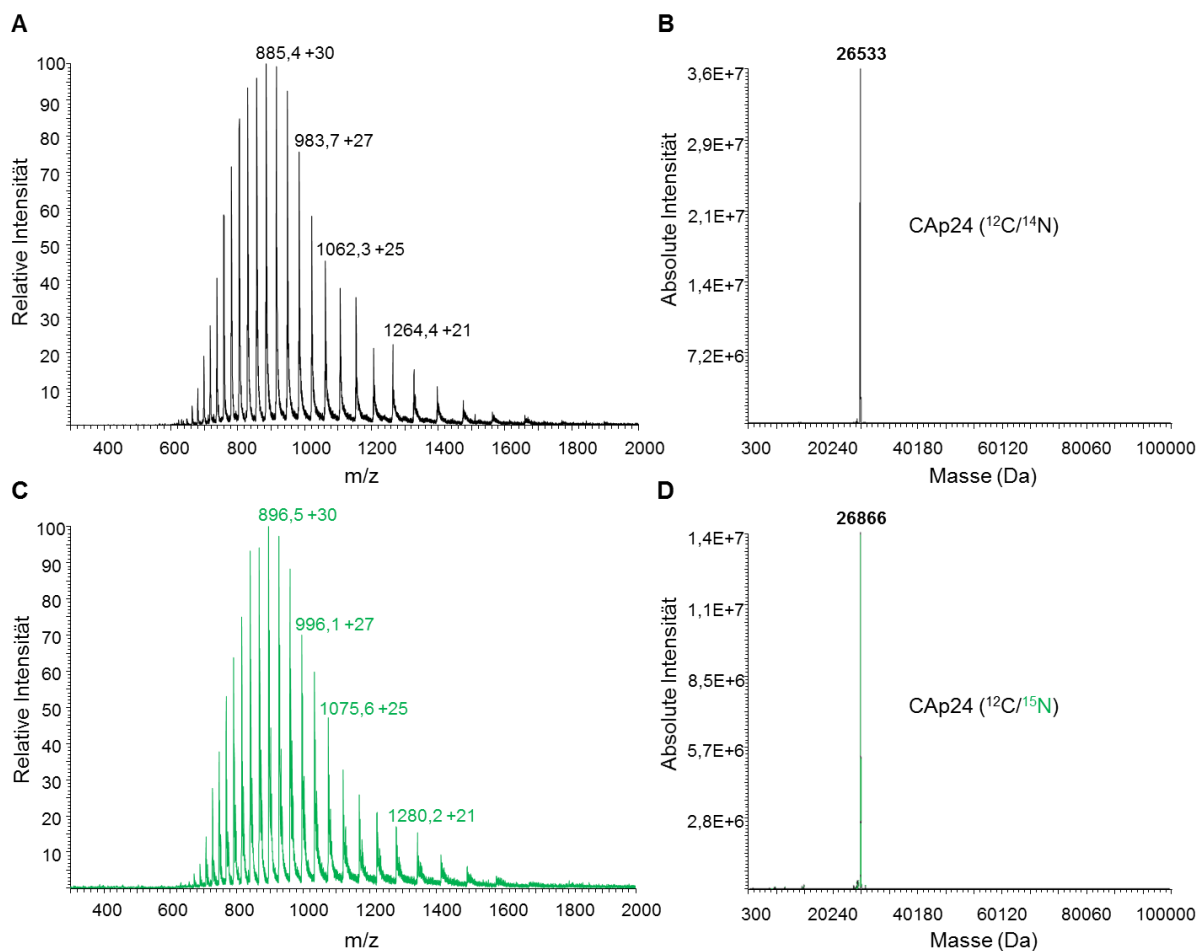
Solche C-terminal verkürzten GAGp55-Formen wurden auch von Luban *et al.* über eine Antikörperdetektion nachgewiesen<sup>172</sup>. Dabei wird berichtet, dass GAGp55 relativ stabil in *E. coli* exprimiert wird und die Verhältnisse der drei GAGp55-Formen konstant bleiben<sup>172</sup>. Auch in anderen Expressionssystemen wie in Insektenzellen<sup>173,174</sup>, Hefen<sup>175</sup> und in Vaccina-Virus-Systemen<sup>176,177</sup> wurden zusätzliche GAGp55-Produkte nachgewiesen. Vermutlich entstehen diese GAGp55-Formen durch eine vorzeitige Termination der Translation, da die Expressionssysteme aus verschiedenen Organismen auch unterschiedliche molekulare Expressionseigenschaften aufweisen können. So unterscheiden sich u.a. die ribosomalen Einheiten, aber auch das umgebende Milieu, was zu Unterschieden in der Expression spezieller Sequenzmotive führen kann. Die hier analysierte GAGp55-Präparation zeigt z.B. eine Abbruchstelle im C-terminalen Bereich vom Nukleocapsidprotein zu Spacer 2. In dieser Sequenzregion findet auch die programmierte ribosomale Leserahmenverschiebung statt, um das Gag-Pol-Polypolprotein zu synthetisieren. Eine Vermutung ist, dass das Ribosom anstelle der Leserahmenverschiebung die Translation durch Ablösen vom RNA-Strang vorzeitig beenden kann. Ob solche Gag-Polypolproteinformen auch in natürlichen Systemen gebildet werden und ob sie eine potenzielle Funktion besitzen, wird in der Literatur nach derzeitigem Stand nicht beschrieben. Aufgrund der dargestellten Problematiken bezüglich der Reinheit der GAGp55-Präparation und zusätzlichen Proteinvarianten wurde das rekombinante Protein nicht als Referenzsubstanz für die HIV-Quantifizierung eingesetzt. Dieses Problem könnte behoben werden,

wenn das His-Tag für die Proteinreinigung am C-Terminus des Proteins gesetzt würde, da so nur das GAGp55-Hauptprodukt aus der Expression isoliert werden kann, vorausgesetzt, dass keine N-terminal verkürzten Varianten existieren. Ein weiteres Problem bleibt jedoch, dass das Protein schwer in Lösung bleibt und zur sichtbaren Protein-Aggregation neigt, da es als Strukturprotein dominierende hydrophobe Bereiche enthält. Dennoch konnten die Daten zur Peptide-Mapping Analyse von GAGp55 zusätzlich zu den Daten, die aus der HIV-Realprobe gewonnen wurden, für die spätere Auswahl von quantotypischen Peptiden verwendet werden.

### 4.2.2. Capsidprotein

Da die kommerzielle Proteinexpression und -reinigung vom Capsidprotein (CAp24) ohne Schwierigkeiten verlaufen ist, wurde die Synthese in natürlicher und markierter Form in Auftrag gegeben. Die Synthese des natürlichen als Referenzsubstanz verwendeten CAp24 erfolgte von der Firma Eurogentec und die Synthese des entsprechend  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins als Spikematerial von der Firma Trenzyme. Beide Proteine wurden, wie das zuvor beschriebene Gag-Polyprotein, rekombinant in *E. coli* unter Fusion eines N-terminalen His-Tags für die spätere Aufreinigung hergestellt. Die Proteine mit Tag-Fusion wurden in PBS-Puffer gelöst zur Verfügung gestellt. Die Sequenz ist in Tabelle 25 auf Seite 126 gezeigt. Die SDS-PAGE-Analysen zeigten ein einziges Produkt bei dem erwarteten Molekulargewicht von ~ 27 kDa. Die Reinheit der Proteinpräparationen wurde mittels Densitometrie-Analysen von Coomassie-gefärbten Gelen bestimmt und beträgt nach Herstellerangaben > 99 %.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit das natürliche und markierte CAp24 massenspektrometrisch auf signifikante Protein-Verunreinigungen analysiert. Abbildung 15 zeigt Ergebnisse, die bei der Fließinjektion von jeweils 300 nmol natürlichem und markiertem CAp24 unter ESI-MS (Linear Ion Trap, ThermoScientific) erhalten wurden. Gezeigt sind die aufsummierten Massenspektren von natürlichem und markiertem CAp24 (Abbildung 15, A/C) und die daraus entfalteten Massenspektren zur Identifizierung von natürlichem und markiertem Protein (Abbildung 15, B/D). Das entfaltete Massenspektrum für das natürliche CAp24 zeigt das Molekulargewicht von 26.533 Da, was exakt dem berechneten Molekulargewicht von CAp24 mit 26.533 Da entspricht (Abbildung 15/B). Ebenso verhält es sich für das  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierte CAp24 mit einem gemessenen und berechneten Molekulargewicht von 26.866 Da bei 100%iger Isotopenanreicherung (Abbildung 15/D).



**Abbildung 15: ESI-LC-MS-Analyse des natürlichen und markierten CAP24-Proteins.**

Summiertes ESI-Massenspektrum im Zeitfenster von 0–1 min und im Scanbereich von 300–2000  $m/z$  für das natürliche CAP24-Protein (A) und  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierte CAP24 (C), sowie das entfaltete Massenspektrum im Massenbereich von 300–100.000 Da für das natürliche CAP24-Protein (B) und  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierte CAP24 (C).

Die ESI-MS-Analysen zeigen, wie auch die Herstelleranalysen, dass es sich um hoch reine Proteinlösungen handelt, da keine signifikanten NebenkompONENTEN identifiziert werden konnten. Aufgrund der sehr guten Handbarkeit und Löslichkeit des Proteins ist das natürliche CAP24-Protein zur Verwendung als Referenzsubstanz und das  $^{15}\text{N}$ -markierte Protein als Spikesubstanz für die HIV-Quantifizierung geeignet. Die genaue Gehaltsbestimmung des natürlichen Proteins als Referenzmaterial erfolgte mit der Aminosäure-Analytik. Die ermittelte Stoffmengenkonzentration und erweiterte Messunsicherheit für das natürliche CAP24 beträgt  $41,28 \text{ nmol/g} \pm 1,4 \text{ nmol/g}$  ( $\pm 3,3 \%$ ).

Die Stoffmengenkonzentration des markierten Proteins wurde anhand des natürlichen Proteins bekannter Stoffmenge nach dem Prinzip der einfachen Isotopenverdünnung in einer ESI-MSMS-Messung ermittelt. Dazu wurden beide Proteinlösungen gleichermaßen eingewogen und tryptisch proteolysiert. Die Quantifizierung des markierten Proteins erfolgte unter Berücksichtigung der Signalverhältnisse der Precursor-Ionen und intensivsten Fragment-Ionen

zwischen den drei natürlichen und  $^{15}\text{N}$ -markierten Peptiden TLNAWVK, WIILGLNK, MYSPTSILDIR, die aus der Proteolyse generiert wurden. Die jeweiligen  $m/z$ -Werte für Precursor- und Fragment-Ionen der drei CAp24-Peptide sind in Tabelle 32 (im Anhang, Seite 140) aufgelistet. Die anhand der drei CAp24-Peptiden ermittelte Stoffmengenkonzentration für das  $^{15}\text{N}$ -markierte CAp24-Protein beträgt  $69,49 \text{ nmol/g} \pm 2,45 \text{ nmol/g}$  ( $\pm 3,5 \%$ ).

Das rekombinante CAp24-Protein wurde, wie das im vorigen Abschnitt beschriebene GAGp55-Protein mittels Peptide-Mapping analysiert. Da das CAp24-Protein leicht zu handhaben ist und die hohe Reinheit es zulässt, es direkt massenspektrometrisch zu analysieren, wurde in diesem Fall die Proteolyse in Lösung und nicht wie bei GAGp55 im Gel durchgeführt. Die CAp24-Proteinabdeckung liegt mit 91,3 % sehr hoch. Es konnten nur das N-terminale His-Tag-fusionierte Peptid und das zu kurze C-terminale Dipeptid nicht identifiziert werden. Alle identifizierten CAp24-Peptide sind in Tabelle 9 aufgelistet. Es ist auffällig, dass im Vergleich zu GAGp55 (siehe Tabelle 8), der Anteil an vollständig gespaltenen Peptiden viel niedriger liegt bzw. der Peptidanteil mit *missed cleavages* höher. Werden nur die Capsid-spezifischen Peptide aus dem Aminosäuresequenzbereich von 133-363 (P04591, UniProtKB) zwischen GAGp55- und CAp24-Probe (Tabelle 8 und Tabelle 9) miteinander verglichen, beträgt der vollständig gespaltene Peptidanteil für GAGp55 67 % und für CAp24 nur 26 %. Durch den höheren Anteil an *missed cleavages* in der CAp24-Probe sind auch die Peptidsequenzüberlappungen stärker ausgeprägt, wodurch die erwartete CAp24-Sequenz nahezu vollständig nachgewiesen werden konnte. Werden in der GAGp55-Probe *missed cleavages* ausschließlich bei bereits bekannten kritischen Sequenzmotiven identifiziert, fällt das Spektrum an *missed cleavages* in der CAp24-Probe breiter aus. Dies liegt vor allem an den unterschiedlichen Proteolyse-Protokollen. Die Proteolyse im Gel für GAGp55 läuft insgesamt effizienter bzw. vollständiger ab, da die präparierten Gelstücke direkt mit der Trypsin-Lösung inkubiert werden, wodurch das Enzym-Substrat-Verhältnis größer ist und Verdünnungseffekte wie bei der Proteolyse in Lösung nicht auftreten. Zudem wird die Trypsin-Reaktion kaum von Enzym-inhibierenden Substanzen gestört, da alle Denaturierungs- oder Alkylierungsmittel vor der Proteolyse im Gel leicht entfernt werden können.



Tabelle 9: Peptide Mapping von rekombinantem CAp24

Peptidsequenz	<i>m/z</i>	Aminosäure-Positionen <sup>1</sup>	<i>missed cleavages</i>
TLNAWVKVVEEK	708,398 <sup>+2</sup>	151-162	1
TLNAWVK	416,240 <sup>+2</sup>	151-157	0
AFSPEVPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQ MLK	1411,688 <sup>+3</sup>	163-202	0
ETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPR	848,919 <sup>+4</sup>	203-232	2
ETINEEAAEWDR	731,826 <sup>+2</sup>	203-214	0
VHPVHAGPIAPGQMREPR	650,348 <sup>+3</sup>	215-232	1
VHPVHAGPIAPGQMR	522,949 <sup>+3</sup>	215-229	0
GSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNK IVR	956,719 <sup>+5</sup>	233-275	3
GSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKR	1158,583 <sup>+3</sup>	233-264	1
WIILGLNKIVR	662,927 <sup>+2</sup>	265-275	1
WIILGLNK	478,800 <sup>+2</sup>	265-272	0
MYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDR	721,617 <sup>+4</sup>	276-299	3
MYSPTSILDIR	648,337 <sup>+2</sup>	276-286	0
QGPKEPFRDYVDRFYK	682,346 <sup>+3</sup>	287-302	3
QGPKEPFRDYVDR	402,455 <sup>+4</sup>	287-299	2
TLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDC*KTILK	958,245 <sup>+4</sup>	303-335	3
TLRAEQASQEVK	453,912 <sup>+3</sup>	303-314	1
AEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDC*KTILK	865,687 <sup>+4</sup>	306-335	2
AEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDC*K	1002,143 <sup>+3</sup>	306-331	1
NWMTETLLVQNANPDC*KTILKALGPAATLEEMMTAC* QGVGGPGHK	971,477 <sup>+5</sup>	315-359	2
NWMTETLLVQNANPDC*KTILK	830,422 <sup>+3</sup>	315-335	1
TILKALGPAATLEEMMTAC*QGVGGPGHK	946,815 <sup>+3</sup>	332-359	1
ALGPAATLEEMMTAC*QGVGGPGHKAR	870,758 <sup>+3</sup>	336-361	1

\*carbamidomethyliertes Cystein

<sup>1</sup>CAp24-Sequenz aus GAGp55 (P04591, Bereich von 133 – 363, UniProtKB)

### 4.2.3. Nukleocapsidprotein

Das Nukleocapsidprotein (NCp7) wurde rekombinant in *E. coli* von der Firma GenScript hergestellt. Im Gegensatz zu den anderen rekombinant hergestellten Proteinen, wurde hier das His-Tag entfernt. Das Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 6,4 kDa ist ein sehr kleines und vor allem basisches Protein, wie nachfolgend die Aminosäuresequenz zeigt:

1      5      10      15      20      25      30      35      40      45      50      55  
MQRGNFRNQRKIVKCFNCGKEGHTARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQAN

C:      Cystein (11 %)  
R,K:    Arginin, Lysin (27,3 %)

Der Anteil an basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin, Histidin) beträgt insgesamt 31 %, davon 27,3 % Lysin- und Arginin-Reste, die potenzielle Schnittstellen für Trypsin darstellen. Dadurch würden bei einer vollständigen Proteolyse viele kleine Peptidbruchstücke entstehen. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, können ein hoher Lysin- und Arginin-Gehalt vor allem in kurzen Abständen und auch umliegende saure Aminosäuren nahe den Schnittstellen zu fehlenden Spaltungen (*missed cleavages*) von Trypsin führen, wodurch ggf. größere Peptidbruchstücke entstehen. Das Protein wurde wie auch die anderen mittels Peptide-Mapping analysiert, um einen Überblick über das Peptidspektrum und mögliche *missed cleavages* zu erhalten. Bei dieser Analyse wurden 89 % der Sequenz identifiziert. In Tabelle 10 sind alle NCp7-Peptide aufgelistet. Wie vermutet fällt der Anteil an *missed cleavages* (bis zu 5) aufgrund der sehr vielen Lysin- und Arginin-Abfolgen sehr hoch aus. Ein vollständig gespaltenes Peptid (ohne *missed cleavages*) konnte gar nicht nachgewiesen werden, da die sehr kleinen Peptidbruchstücke vermutlich innerhalb der Totzeit von der Säule eluieren und den Detektor des Massenspektrometers nicht erreichen. Anhand der Datenlage ist das NCp7-Protein für Quantifizierungszwecke schwierig zu handhaben, da bei einer wahrscheinlich unvollständigen NCp7-Proteolyse sichergestellt werden muss, dass die Proteolyse und die Kinetik gleichermaßen für das natürliche Protein aus der Probe und einem markierten Proteinstandard abläuft. Aus diesen Gründen und der hohen Kosten für die Produktion markierter Proteine wurde auf die weitere Synthese eines markierten NCp7-Proteins verzichtet. Stattdessen wurde der potenzielle Einsatz möglicher Peptidstandards als alternative Quantifizierungsstrategie weiter untersucht, was im nächsten Kapitel näher erläutert wird.

Tabelle 10: Peptide Mapping von rekombinantem NCp7

Peptidsequenz	<i>m/z</i>	Aminosäure-Positionen <sup>1</sup>	<i>missed cleavages</i>
MQRGNFR	454,730 <sup>+2</sup>	378-384	1
GNFRNQRKIVKC*FNC*GKEGHTAR	556,284 <sup>+5</sup>	381-403	5
NQRKIVKC*FNC*GKEGHTAR	576,546 <sup>+4</sup>	385-403	4
NQRKIVKC*FNC*GK	413,718 <sup>+4</sup>	385-397	3
KIVKC*FNC*GKEGHTAR	635,657 <sup>+3</sup>	388-403	3
KIVKC*FNC*GK	627,328 <sup>+2</sup>	388-397	2
IVKC*FNC*GK	563,280 <sup>+2</sup>	389-397	1
C*FNC*GKEGHTAR	479,543 <sup>+3</sup>	392-403	1
KKGC*WKC*GKEGHQMKDC*TER	631,542 <sup>+4</sup>	410-429	5
GC*WKC*GKEGHQMKDC*TER	567,494 <sup>+4</sup>	412-429	3
C*GKEGHQMKDC*TERQAN	683,628 <sup>+3</sup>	416-432	3
C*GKEGHQMKDC*TER	579,248 <sup>+3</sup>	416-429	2
EGHQMKDC*TERQAN	852,365 <sup>+2</sup>	419-432	2
EGHQMKDC*TER	695,796 <sup>+2</sup>	419-429	1
DC*TERQAN	497,206 <sup>+2</sup>	425-432	1

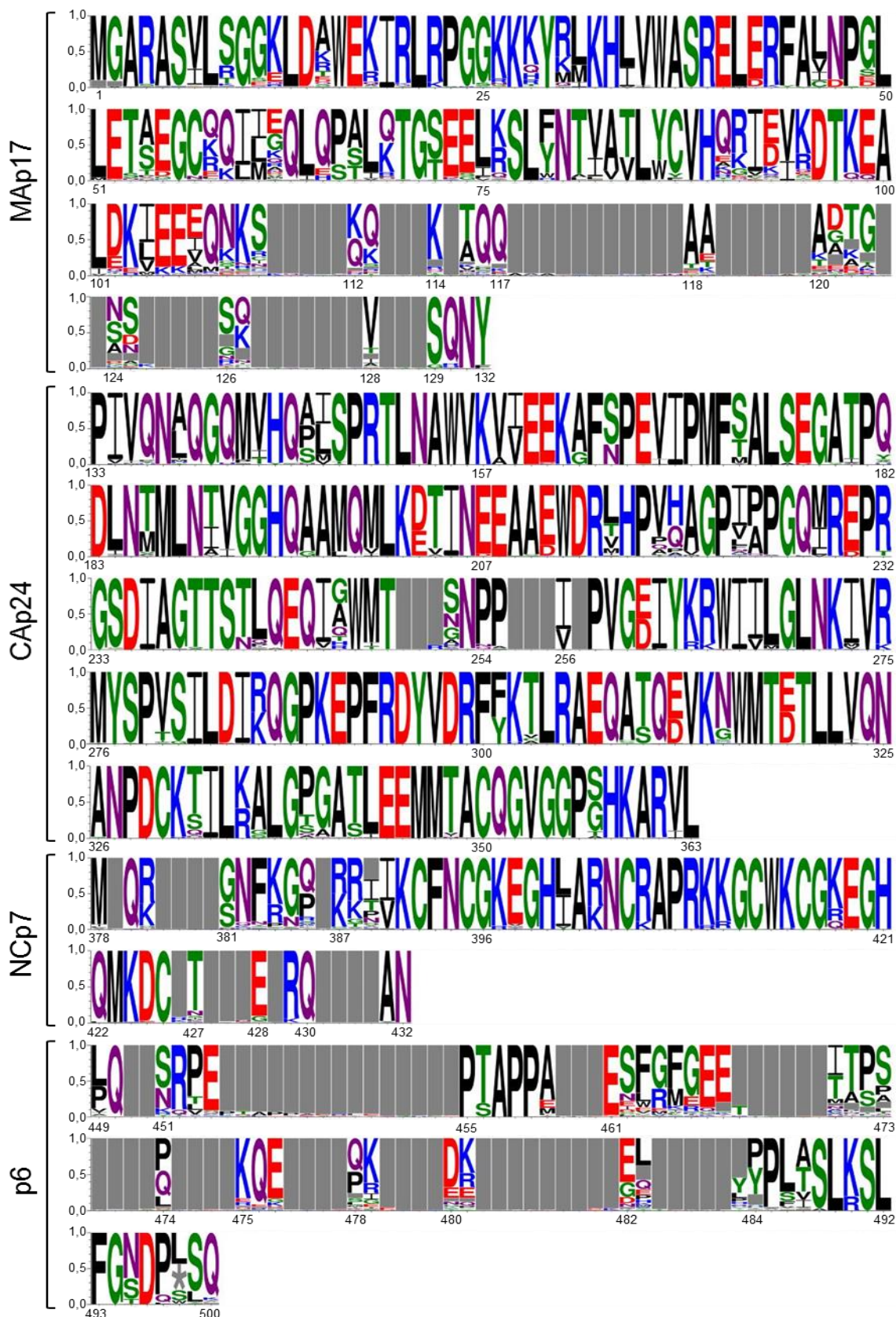
\*Carbamidomethyliertes Cystein

<sup>1</sup>NCp7-Sequenz aus GAGp55 (P04591, Bereich von 378-432, UniProtKB)

### 4.3. Auswahl von HIV-Peptiden und Referenzmaterialien zur HIV-Quantifizierung

Ein wichtiger Aspekt bei der Methodenentwicklung für die GAGp55-Quantifizierung ist die Auswahl geeigneter HIV-Peptide. Eine vollständige Recherche über die Eigenschaften des GAGp55 bezüglich der Bildung von Isoformen, Splice-Varianten oder posttranslationale Modifikationen ist dabei essentiell, da diese natürlichen Modifikationen die Stöchiometrie betroffener Proteinregionen verändern und somit ggf. der quantitative Wert beeinflusst wird. Auch die Aminosäuresequenz und die unmittelbare Sequenzumgebung tryptischer Peptide sollte kritisch beurteilt werden, da durch bestimmte Aminosäuren oder Motive auch artifizielle Modifikationen bei der Probenvorbereitung oder *missed cleavages* begünstigt werden können, die wiederum einen Fehler in der Quantifizierung verursachen. Auch massenspektrometrische Aspekte wie die Ionisierungseffizienz und Fragmentierung von Peptiden sowie Matrixeffekte spielen eine wichtige Rolle. Einen groben Überblick und eine erste Einschätzung dieser Aspekte liefern die Ergebnisse der Peptide-Mapping-Experimente des HIV-Materials (siehe Abbildung 12 und Tabelle 6, Seite 55-56) zusammen mit den Ergebnissen der rekombinanten Proteine aus Kapitel 4.2 „Validierung von HIV-Protein-Referenzmaterialien“ (Seite 58). Einige dieser Punkte wurden bereits in den vorherigen Kapiteln erörtert und diskutiert.

Vor allem im Bereich der HIV-Analytik ist es aufgrund der sehr hohen Mutationsrate von HIV wichtig, konservierte Sequenzbereiche für eine quantitative Methode auszuwählen, um sie für ein weites HIV-Variantenspektrum anwenden zu können und Abweichungen in den Messungen gering zu halten. Zur Untersuchung von konservierten Sequenzbereichen wurde ein Aminosäuresequenz-Alignment der Strukturproteine aus GAGp55 mithilfe der Los Alamos HIV-Sequenzdatenbank erstellt, welches in Abbildung 16 gezeigt ist. Bei der Peptidauswahl wurde darauf geachtet, dass die Peptide so klein wie möglich sind, aber mindestens 6 Aminosäuren enthalten, um den Grad der Sequenzkonservierung zu erhöhen. Aufgrund der eher kurzen Peptidlänge ist es umso wichtiger, die ausgewählten Peptide auf deren Spezifität zu überprüfen, was mithilfe des Aminosäuresequenz-Blast-Tools der UniProtKB-Proteindatenbank durchgeführt wurde. Demnach zeigen alle in diesem Kapitel diskutierten Peptide keine Sequenzhomologien zu anderen Proteinen oder Organismen auf. Peptide mit gleicher Summenformel durch gleiche Art und Anzahl an Aminosäuren aber unterschiedlicher Anordnung können durch die Analyse der Fragmentionen-Spektren in MSMS-Analysen z.B. in den Peptide-Mapping-Experimenten ausgeschlossen werden.



**Abbildung 16: Aminosäure-Sequenz-Alignment der GAG-Polyproteinregion.**

199 Sequenzen aus dem HIV-1 Sequence Compendium 2017 der Los Alamos HIV-Datenbank beinhalten Sequenzen aus den HIV-1 Subtypen und CRFs der Gruppe M sowie der Gruppen N, O, P und SIVcpz. Sequenz-Alignment von MAP17 (aa 1-132), CAP24 (aa 133-363), NCp7 (aa 378-432), p6 (aa 449-500). Spacer-Peptide 1 + 2 (aa 364-377, aa 433-448) wurden nicht berücksichtigt. Y-Achse (0-1,0) zeigt die Häufigkeit der Aminosäure.

#### 4.3.1. Peptide für die Matrix-Quantifizierung

Das Sequenz-Alignment für das Matrixprotein in Abbildung 16 zeigt vor allem eine hohe Konservierung im *N*-terminalen Proteinbereich. Anhand der Ergebnisse zum Peptide-Mapping im HIV-Probenmaterial, aufgelistet in Tabelle 6 (Seite 56) konnten drei potenziell geeignete Peptide identifiziert werden: HIVWASR, FAVNPGLLETSEGCR und SLYNTVATLYCVHQR, deren Intensitäten in einer Größenordnung liegen. Vor allem das Peptid HIVWASR (aa 33-39 in Abbildung 16) ist sehr konserviert und dominiert vor allem im HIV-1 Subtyp B und D. Sequenzen anderer Subtypen enthalten überwiegend anstelle von Isoleucin an Position 2 die chemisch ähnliche Aminosäure Leucin. Die beiden anderen Peptidsequenzen FAVNPGLLETSEGCR (aa 44-58) und SLYNTVATLYCVHQR (aa 77-91) in Abbildung 16 variieren in der Sequenz dagegen stärker zwischen den verschiedenen Subtypen. Bekannte biologische Modifikationen von Aminosäuren in den einzelnen Peptidsequenzen sind nicht bekannt. Für die Quantifizierung des Matrixproteins wurde die Synthese von zwei Peptidbruchstücken HIVWASR und SLYNTVATLYCVHQR in natürlicher und markierter Form in Auftrag gegeben. Die Eigenschaften der entsprechenden Materialien werden im letzten Abschnitt 4.3.6 „Peptid-Referenzmaterialien“ näher beschrieben.

#### 4.3.2. Peptide für die Capsid-Quantifizierung

Anhand der Abbildung 16 ist zu erkennen, dass vor allem das zentral gelegene Capsidprotein hoch konserviert vorliegt. Da das Capsid-Protein als rekombinantes Referenz- und Spikematerial zur Verfügung steht (siehe Abschnitt 4.2.2 „Capsidprotein“, Seite 64), ist die Verwendung einzelner Peptidstandards für die Quantifizierung nicht notwendig. Nahezu alle tryptischen Peptide können mit diesen Materialien abgedeckt werden. Da für die Quantifizierung des Capsids ein Proteinspike verwendet werden kann, sind die Einflüsse auf die Proteolyse-Effizienz weniger bedeutend, da die Proteolyse des natürlichen Proteins aus der Probe und der des Protein-Spikes gleichermaßen ablaufen sollte. Bei der empirischen Peptidanalyse des HIV-Probenmaterials in Tabelle 6 (Seite 56) zeigten vor allem die drei kurzen CAP24-Peptide TLNAWVK, WIILGLNK und MYSPTSILDIR sehr gute Intensitäten auf und sind in den hier verwendeten HIV-Proben nachweisbar. Laut des Sequenz-Alignments (Abbildung 16) und der entsprechenden Sequenzanalysen sind vor allem die Peptide TLNAWVK (aa 151-157) und WIILGLNK (aa 165-172) in allen HIV-1 Gruppen hoch konserviert. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Peptidsequenz TLNAWVK sogar in HIV-2 und in den verschiedenen SIV-Sequenzen der Menschenaffen konserviert ist. Dieses Peptid eignet sich daher für eine Quantifizierung eines sehr großen HIV- und SIV-Variantenspektrums. Die dritte Peptidsequenz MYSPTSILDIR (aa 276-286 in Abbildung 16), die in dem hier genutzten HIV-

Stamm nachgewiesen wurde, ist dagegen eher spezifisch für einzelne bestimmte Subtyp B-Sequenzen. Wie auch in Abbildung 16 ersichtlich, enthält der weitaus größere Anteil an Virusisolaten aus allen Subtypen anstelle der Aminosäure Threonin an Position 5 die Aminosäure Valin mit teilweise C-terminalem Lysin (K) anstelle von Arginin (R). Diese Peptidsequenz eignet sich deshalb eher für die Quantifizierung der hier genutzten Virusvariante, aber nicht für andere HIV-1 Subtypen. Eine erste Quantifizierung des Capsid-Proteins aus den HIV-Proben unter Verwendung des  $^{15}\text{N}$ -markierten CAP24-Standards und Proteomics Grade Trypsin für die Proteolyse zeigte keine signifikanten Unterschiede in den quantitativen Werten zwischen den drei Peptiden: 11,3 pmol/mL TLNAWVK, 11,1 pmol/mL WIILGLNK und 10,9 pmol/mL MYSPTSILDIR mit einer durchschnittlichen Konzentration von  $11,1 \text{ pmol/mL} \pm 0,21 \text{ pmol/mL}$  ( $\pm 1,9 \%$ ). Die Quantität des Peptids MYSPTSILDIR könnte wie in dem Beispiel gezeigt tendenziell niedriger liegen als die der anderen CAP24-Peptide, da in der Literatur eine Phosphorylierung am zweiten Serin-Rest des Peptids MYSPTSILDIR beschrieben wird<sup>163</sup>, was bei der Verwendung des CAP24-Proteinstandards zu einer Unterschätzung der Quantität führen könnte.

Zusätzlich zum CAP24-Protein-Referenzmaterial und -Spikematerial wurde das TLNAWVK-Peptid als Referenz- und Spikematerial genutzt und charakterisiert (siehe Abschnitt 4.3.6 „Peptid-Referenzmaterialien“).

#### 4.3.3. Peptide für die Nukleocapsid-Quantifizierung

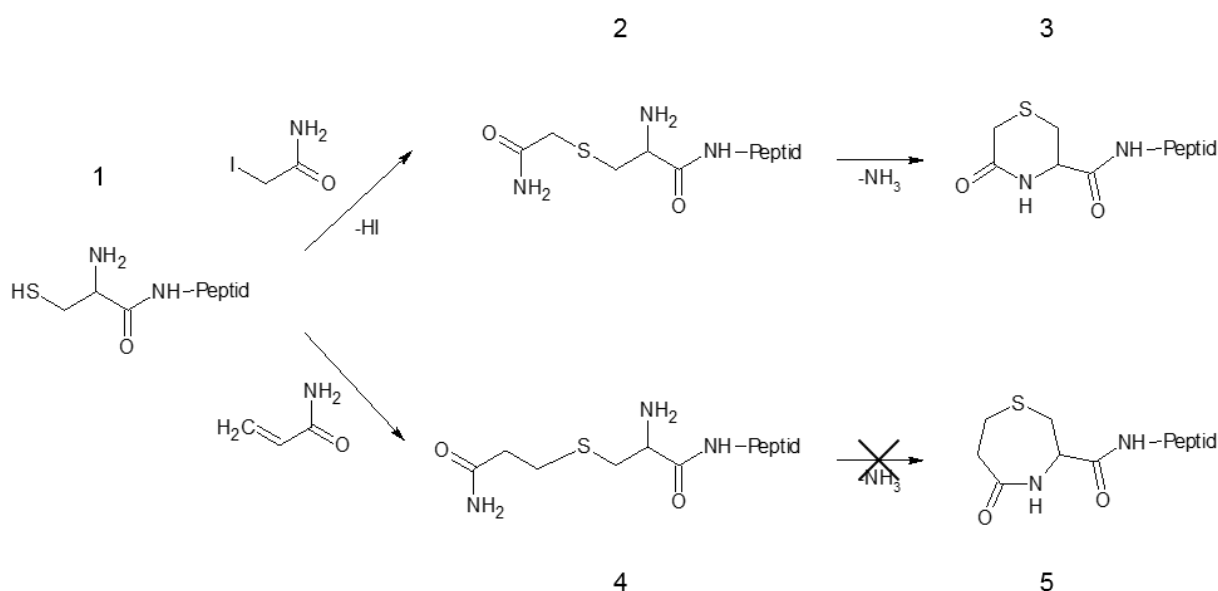
Parallel zur Charakterisierung des NCp7-Proteins als Referenzmaterial (siehe Seite 68) wurde auch nach geeigneten NCp7-Peptid-Standards für die Quantifizierung gesucht. Anhand der Peptide-Mapping Ergebnisse in den HIV-Proben (Tabelle 6, Seite 56) und der Analysen zum rekombinant hergestellten NCp7 (Tabelle 10, Seite 69) stellt die Quantifizierung des Proteins hinsichtlich der Richtigkeit aufgrund einiger unerwünschter Sequenzmotive eine Herausforderung dar. Vollständig gespaltene Peptidbruchstücke konnten in diesen Analysen nicht nachgewiesen werden, da sie möglicherweise bei vollständiger Spaltung zu klein sind oder erst gar nicht effizient vollständig gespalten werden können. Die größtmöglichen vollständig gespaltenen Peptide mit einer Länge von 6 Aminosäuren sind (K)CFNCGK(E), (K)EGHTAR(N) oder (K)EGHQMK(D) mit angrenzenden Aminosäuren in Klammern. Die Sequenzen der drei Peptide deuten alle auf einen eher schwierigen und langsamen Bildungsprozess aufgrund der angrenzenden E/D-Aminosäuren an den K/R-Schnittstellen hin. Zudem sind sie sehr kurz und polar und eluieren demnach schnell zusammen mit anderen kleineren Molekülen von der Chromatographie-Säule. Da diese Peptide in den Peptide-Mapping Experimenten nicht identi-

fiziert werden konnten, wurde in einer separaten Analyse gezielt danach gesucht. Ausschließlich das CFNCGK konnte eindeutig aber auch mit einer deutlich geringeren Intensität ( $\sim 1/50$ ) als die anderen HIV-Peptide z.B. aus CAp24 nachgewiesen werden. Im Gegensatz konnten die beiden anderen NCp7-Peptide gar nicht identifiziert werden, da vermutlich aufgrund des enthaltenen Histidins bevorzugt dreifach positiv geladene Peptide generiert werden, wodurch zu kleine  $m/z$ -Werte entstehen. Deshalb wurde als mögliches vollständig gespaltenes Peptid CFNCGK ausgewählt, da es nach einem separaten Scan und gezielter Suche in der HIV-Realprobe identifiziert werden konnte. Zudem zeigt das Sequenz-Alignment in Abbildung 16, dass CFNCGK (aa 392-397) in allen HIV-1 Subtypen hoch-konserviert vorliegt, da es Teil eines der beiden Zinkfinger-Motive ist, die an der Bindung der viralen RNA beteiligt sind. Da dieses kurze Peptid zwei reaktive Cysteingruppen enthält, müssen diese effizient mittels Carbamidomethylierung blockiert werden, um intra- und auch intermolekulare Disulfidbrückenbildung zu vermeiden. Diesbezüglich ist Iodacetamid das am häufigsten verwendete Reagenz, das die reaktive Sulfhydrylgruppe von Cystein carbamidomethyliert (Abbildung 17/1-2). Problematisch ist dabei die *N*-terminale carbamidomethylierte Cysteingruppe des Peptids, da der *N*-Terminus als nukleophile Gruppe die Carbonylgruppe des *N*-terminalen carbamidomethylierten Cysteins angreift und dadurch endständig unter Ammoniakabspaltung ein 6-Ring-Heterozyclus, die (R)-5-Oxohydro-1,4-thiazin-3-carbonsäure (Pyro-C-Form) gebildet wird<sup>178-180</sup> (Abbildung 17/3). Diese *N*-terminale Zyklisierungsreaktion als artifizielle Modifikation konnte auch für das NCp7-Peptid CFNCGK nachgewiesen werden, da das natürliche Peptid und die Pyro-C-Form sich in der Masse und Ladung unterscheiden. Die Experimente zeigten, dass die Menge an natürlichem Peptid mit der Inkubationsdauer bei unter Proteolyse-Bedingungen vorherrschenden basischen pH bevorzugt zur Pyro-C-Form zyklisiert, was auch ein Grund für die sehr geringe Intensität der natürlichen Peptidform im Vergleich zu anderen Peptiden ist (Ergebnisse nicht gezeigt). Unter basischen Bedingungen ist die terminale Aminogruppe nicht protoniert, so dass sie als Nucleophil zur Verfügung steht. In der SCX-Chromatographie können diese beiden Peptid-Formen leicht voneinander getrennt werden, da sich auch der entsprechende Protonierungsgrad unterscheidet. Das natürliche CFNCGK-Peptid ist bevorzugt zweifach-protoniert (*N*-Terminus und am C-terminalen Lysin). Dagegen entfällt die zweite basische Funktion durch die beschriebene Zyklisierung, weshalb diese Form vorwiegend einfach protoniert vorliegt. Diese eluiert eher von der SCX-Säule als die stärker gebundene zweifach-protonierte natürliche Peptidform.

Da diese Nebenreaktion des Peptids für eine genaue NCp7-Quantifizierung ungünstig ist, wurde eine alternative Blockierung der Cysteingruppen mittels Acrylamid gewählt. Acrylamid kann mit reaktiven Sulfhydrylgruppen in Form einer Michael-Addition reagieren, sodass carbamidoethylierte Cysteingruppen entstehen (Abbildung 17/4). Hier ist ein Kohlenstoff mehr



enthalten als im carbamidomethylierten Cystein. Demnach müsste bei einem nukleophilen Angriff des *N*-Terminus auf die Carbonylgruppe des carbamidoethylierten Cysteins ein 7-Ring-Heterozyklus gebildet werden, was sterisch nicht begünstigt ist (Abbildung 17/5). Dies bestätigten auch die Analysen zu carbamidoethylierten Cystein in CFNCGK, da in diesem Fall nur ein einziges Produkt gebildet wurde.



**Abbildung 17: Zyklisierung von *N*-terminalem Cystein in Peptiden**

Cystein-Reste in Peptiden (1) werden mit Iodacetamid über eine S<sub>N</sub>2-Reaktion carbamidomethyliert (2). Der *N*-Terminus greift nukleophil die Carbonylgruppe des *N*-terminalen carbamidomethylierten Cysteins an, wodurch unter Ammoniakabspaltung die peptidgebundene 5-Oxohydro-1,4-thiazin-3-carbonsäure (Pyro-C-Form), ein 6-Ring-Heterozyklus, entsteht (3).

Cystein-Reste in Peptiden werden mit Acrylamid über eine Michael-Addition carbamidoethyliert (4). Eine Zyklisierung unter Ammoniakabspaltung zu einem 7-Ring-Heterozyklus ist sterisch nicht begünstigt.

#### 4.3.4. Peptide für die p6-Quantifizierung

Im Vergleich zu den anderen diskutierten Strukturproteinen ist die Sequenz des kleinen p6-Peptids mit einer Länge von 52 Aminosäuren sehr heterogen, was auch anhand der Sequenzanalyse in Abbildung 16 zu sehen ist. Zudem ist es als Phosphorprotein bekannt<sup>164–166</sup> und ist sehr Prolin-reich, weshalb einige Peptidsequenzen für die Quantifizierung vermutlich nicht geeignet sind. Das Sequenz-Alignment in Abbildung 16 zeigt vor allem eine Konservierung für die Aminosäurebereiche PTAPPE (aa 455-460) und LRSFLG (aa 489-494). Das erste Motiv P(T/S)AP bildet die primäre L-Domäne (*late assembly domain*), die das zelluläre Protein Tsg101 bindet, um den Abschnürungsprozess neu-synthetisierter Viren anzutreiben<sup>90,181</sup>. Die konservierte C-terminale Domäne LRSFLG dagegen ist verantwortlich für die Bindung des viralen Proteins Vpr, um es in neu-synthetisierte Viruspartikel mit einzubauen<sup>182,183</sup>. In der realen HIV-Probe wurde ausschließlich das C-terminale Peptid SLFGNDPSSQ (siehe Tabelle

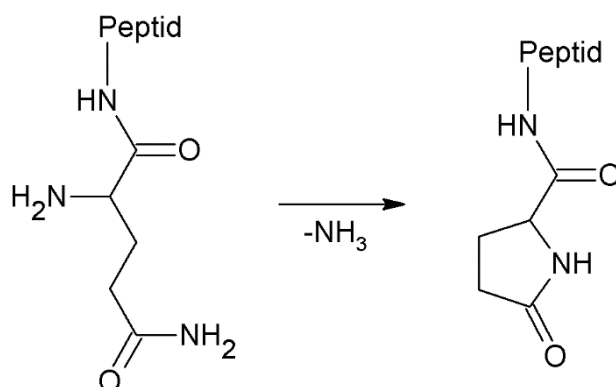
6, Seite 56) nachgewiesen, das einen Teil des Vpr-Bindemotivs LRSLFG enthält. Da p6 als Phosphoprotein beschrieben wird, wurde gezielt nach möglichen phosphorylierten Serin-Resten im Peptid SLFGNDPSSQ gesucht. Dabei konnten jedoch keine Phosphorylierungsmuster identifiziert werden. Auch in der Literatur ist dazu nichts bekannt. Das Sequenz-Alignment in Abbildung 16 und die entsprechenden Analysen zeigen, dass diese p6-Peptidsequenz spezifisch für das hier genutzte HIV-1 Subtyp B Isolat ist und weniger geeignet ist für die Quantifizierung eines weiten HIV-Variantenspektrums. Für die Quantifizierung von p6 wurde dieses Peptid SLFGNDPSSQ in natürlicher und markierter Form als Referenzmaterial charakterisiert.

#### **4.3.5. Peptide mit Protease-Schnittstelle für die GAGp55-Quantifizierung**

Die vorherigen diskutierten Peptide für die Quantifizierung der Strukturproteine MAp17, CAp24, NCp7 und p6 decken die jeweiligen Proteine ab, aber auch potenzielle Gag-Polyproteine, die noch nicht enzymatisch prozessiert vorliegen und charakteristisch für unreife Viruspartikel sind. Deshalb liefern sie einen Wert über die Gesamt-Strukturproteinmenge. HIV-Peptide, die zwei aneinander liegende Strukturproteine im GAGp55 überlappen und so eine virale Protease-Schnittstelle enthalten, sind demzufolge GAGp55-spezifisch. Die virale Protease schneidet das Gag-Polyprotein während des Reifungsprozesses an insgesamt 5 Positionen: MAp17\_CAp24\_Sp1\_NCp7\_Sp2\_p6. Der Vergleich zwischen der Gesamt-Strukturproteinmenge zur GAGp55-spezifischen Menge gibt Ausschluss über den Reifegrad einer Viruspräparation.

Die Analysen zum rekombinanten GAGp55 in Tabelle 8 (Seite 61) zeigen die möglichen tryptischen Peptide, die eine solche virale Protease-Schnittstelle enthalten. Dies sind 4 Peptide, die eine Überlappung zeigen für MAp17-CAp24, CAp24-SP1-NCp7, NCp7-Sp2 und Sp2-p6. Die Ergebnisse zur Charakterisierung des Virusmaterials in Abbildung 11 (Seite 54) und Tabelle 6 (Seite 56) zeigen, dass solche Peptide in den Peptide-Mapping-Experimenten nicht nachgewiesen werden konnten, da der Großteil der Viruspartikel in einem reifen Zustand vorliegt. In den HIV-Proben konnte nur der Sequenzbereich zwischen NCp7 und Sp2 eindeutig identifiziert werden. Dies betrifft den C-terminalen Teil von NCp7 mit der Sequenz (R)QAN und den anschließenden N-terminalen Teil von Sp2 mit der Sequenz FLGK. Im nicht-prozessierten GAGp55 sind diese beiden Sequenzteile ein intaktes tryptisches Peptid mit Protease-Schnittstelle (R)QAN<sup>^</sup>FLGK, das spezifisch ist für GAGp55. Eine GAGp55-spezifische Quantifizierung könnte für andere analytische Anwendungen interessant sein z.B. für die Charakterisierung von HIV-Protease-Inhibitoren, bei deren Einsatz die GAGp55-Fraktion dominieren sollte. Dieses Peptid QANFLGK, welches NCp7 und Sp2 überlappt, ist zudem zwischen den

verschiedenen HIV-Subtypen sehr konserviert, da es auf Genomebene die Stelle der Leserahmenverschiebung für die Gag-Pol-Synthese beinhaltet (siehe Abbildung 2/B, Seite 8). Deshalb ist zu beachten, dass dieses Peptid ausschließlich für das Gag-Polyprotein spezifisch ist. Im Gag-Pol-Polyprotein verändert sich dagegen die Peptid-Sequenz durch die Leserahmenverschiebung zu QANFFR und enthält dann einen Teil der Sequenz des Transframepeptids aus dem Pol-Leserahmen, weshalb dieses Peptid wiederum Gag-Pol-spezifisch wäre. Für den potenziellen Einsatz des Peptids QANFLGK für eine GAGp55-spezifische Quantifizierung muss darauf geachtet werden, dass auch das *N*-terminale Glutamin (Q), eine Zyklisierungsreaktion zum  $\gamma$ -Lactam eingehen kann und dadurch Pyroglutamat (Pyro-E) gebildet wird<sup>180,184</sup> (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Zyklisierung von *N*-terminalem Glutamin zu Pyroglutamat, einem  $\gamma$ -Lactam**

Diese Reaktion läuft ähnlich wie beim bereits beschriebenen *N*-terminalen carbamidomethylierten Cystein ab und wird auch durch die Reaktionsbedingungen während der Proteolyse wie basischer pH unter 37 °C Inkubationstemperatur begünstigt (siehe Abschnitt 4.3.3 „Peptide für die Nukleocapsid-Quantifizierung“, Seite 73). Die Bildung von zwei Peptidprodukten, in diesem Fall das natürliche Peptid und die Pyro-E-Form, sollte für genaue quantitative Ergebnisse vermieden werden. Dies könnte z.B. durch den Einsatz des Enzyms Glutaminyl-Peptid-Cyclotransferase erreicht werden, das nach der Proteolyse der Probe zugesetzt werden kann, um letztendlich alle verbliebenen *N*-terminalen Glutamin-Reste in die Pyro-E-Form umzuwandeln<sup>185</sup>. Für potenziell weiterführende Projekte z.B. für die GAGp55-spezifische Quantifizierung, was für verschiedene Forschungsbereiche relevant sein kann, wurde dieses GAGp55-spezifische Peptid QANFLGK in natürlicher und markierter Form als Referenz- und Spikematerial kommerziell synthetisiert.

#### 4.3.6. Peptid-Referenzmaterialien

Die chemische Synthese aller in den vorigen Abschnitten diskutierten Peptide wurde in natürlicher und markierter Form in Auftrag gegeben. Sie wurden kommerziell über HPLC aufgereinigt und als TFA-Salz zur Verfügung gestellt. Die bereitgestellten Peptidmaterialien sind alle im Anhang in Tabelle 24 (Seite 125) aufgelistet. Die natürlichen und markierten Peptide wurden alle gleichermaßen eingewogen und in MilliQ-Wasser gelöst. Da die natürlichen Peptide als Referenzmaterialien eingesetzt werden, wurde von diesen eine Aminosäureanalytik (AAA) durchgeführt. Vor jeder AAA-Analyse wurde zusätzlich die Reinheit der bereits HPLC-gereinigten Peptidlösungen über LC-MS überprüft.

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Stoffmengenkonzentration der Peptidlösungen mittels AAA und deren weitere Messunsicherheiten sind in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11: Stoffmengenkonzentration und erweiterte Messunsicherheit der HIV Peptid-Referenzmaterialien**

Peptid	Protein	c [nmol/g]	U [nmol/g]	U [%]
HIVWASR	MAp17	743,5	18,0	2,5
SLYNTVATLYCVHQR	MAp17	389,7	9,0	2,3
TLNAWVK	CAP24	84,8	2,5	2,9
CFNCGK	NCp7	95,3	2,8	2,9
QANFLGK	NCp7-Sp2	91,4	2,5	2,7
SLFGNDPSSQ	p6	786,5	17,0	2,3

Die Konzentration der markierten Peptidlösungen wurde anhand der natürlichen Referenzmaterialien angepasst und bestimmt.

## 4.4. Massenspektrometrische Methodenentwicklung

### 4.4.1. Massenspektrometrisches Quantifizierungsverfahren von HIV-Proteinen

Das zur HIV Protein-Quantifizierung genutzte massenspektrometrische Verfahren ist in Kapitel „3.6 Proteinanalytik am LC-ESI-Orbitrap Elite Gerätesystem“ und im Abschnitt „3.6.1 Analyseverfahren zur Quantifizierung von HIV-Proben“ (Seite 42) beschrieben.

Für klassische zielgerichtete Protein-Quantifizierungsverfahren wird am häufigsten die MRM (*multiple reaction monitoring*)-Technik unter Verwendung eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers (QqQ MS) genutzt<sup>186,187</sup>. Dabei werden die Ziel-Precursor-Ionen im ersten Quadrupol (Q1) von der gesamten Ionenpopulation gefiltert und im zweiten Quadrupol (Q2) mittels CID fragmentiert. Im dritten Quadrupol (Q3) erfolgt die Isolierung von spezifischen Fragmentationen von den Gesamt-Fragmentationen. Dadurch werden eine hohe Selektivität und Sensitivität erreicht<sup>188,189</sup>.

Hybridmassenspektrometer bei denen der dritte Quadrupol durch einen Massenanalysator mit höherer Auflösung wie Orbitrap (z.B. Q Exactive)<sup>190,191</sup> oder TOF (*time of flight*)<sup>192</sup> ersetzt wird, bieten die Möglichkeit der Quantifizierung mit der PRM (*parallel reaction monitoring*)-Technik<sup>193</sup>. Der einzige Unterschied von PRM zu MRM besteht darin, dass von jedem isolierten Precursor-Ion ein full-MSMS-Spektrum (parallele Detektion aller Fragmentationen) im hochauflösenden Massenanalysator aufgenommen wird<sup>193</sup>. Dadurch kann PRM vor allem in komplexen biologischen Proben gegenüber MRM eine bessere Selektivität bieten<sup>194</sup>. Auch die Sensitivität (Signal-Rausch-Verhältnis) wird verbessert<sup>190</sup>.

Das in dieser Arbeit genutzte Hybridmassenspektrometer Orbitrap Elite, das anstelle eines Quadrupols die lineare Ionenfalle mit der Orbitrap als Massenanalysatoren kombiniert, wird dagegen eher für Proteomics-Experimente bzw. für die Proteom-Forschung verwendet als für die zielgerichtete Quantifizierung mittels PRM<sup>195–197</sup>. Dies liegt vor allem an der dualen Konfiguration der linearen Ionenfalle, die bewirkt, dass die Isolation der Precursor-Ionen sowie der gesamte Arbeitszyklus (*duty cycle*) länger dauert, verbunden mit einem Abfall der Sensitivität und Multiplexing-Kapazität<sup>196</sup>.

In dieser Arbeit wurde die Orbitrap Elite neben den Peptide-Mapping-Experimenten dennoch zur absoluten Protein-Quantifizierung eingesetzt und verschiedene Techniken wie PRM- und Precursor-Ionen-basierte Quantifizierung getestet. Für PRM-Analysen wurden die Precursor-Ionen in der Orbitrap zunächst hoch-auflösend detektiert und anschließend die Ziel-Precursor-Ionen in der linearen Ionenfalle selektiert und CID-fragmentiert. Für die Quantifizierung wurden zielgerichtet die Precursor-Ionen und intensivsten Fragmentationen aus dem Ionen-Chromatogramm extrahiert und die Peak-Flächen integriert. In Tabelle 32 (Anhang, Seite 140) sind die *m/z*-Werte der Precursor- und intensivsten Fragmentationen aufgelistet. Für die Precursor-

Ionen-basierte Quantifizierung im MS<sup>1</sup>-Scan wurde ausschließlich die monoisotopische Masse der Precursor-Ionen von natürlichem und markiertem Peptid herangezogen.

Ergebnisse einer Beispiel-Quantifizierung für CAp24 aus einer HIV-Probe mittels <sup>15</sup>N-markierten CAp24-Standard sind in Tabelle 12 gezeigt. Dabei zeigt der MS<sup>1</sup>-Scan die Ergebnisse der Precursor-basierten Quantifizierung der CAp24-spezifischen Peptide TLNAWVK, WIILGLNK und MYSPTSILDIR. MS<sup>2</sup> als PRM-Analyse wurde einmal für jedes Peptid separat gemessen (3 einzelne MS<sup>2</sup>-Messungen) und einmal alle drei Peptide zusammen in einer MS<sup>2</sup>-Messung. Anhand der Ergebnisse in Tabelle 12 ist zu erkennen, dass die Abweichungen der Messwerte zwischen den drei Peptiden im MS<sup>1</sup>-Scan mit  $\pm 1,9\%$  am geringsten ausfallen im Vergleich zu den einzelnen MS<sup>2</sup>-Messungen mit  $\pm 6,1\%$ . Die einzelnen MS<sup>2</sup>-Messungen der Peptide liefern noch vergleichbare Ergebnisse, liegen aber um etwa 20 % niedriger als im einfachen Scan-Modus. Werden alle Peptide in einer MS<sup>2</sup>-Messung erfasst, schwanken die Werte sehr stark. Vor allem der Wert (2,4) für MYSPTSILDIR weicht eindeutig von den Werten aus dem MS<sup>1</sup>-Scan und aus den einzelnen MS<sup>2</sup>-Messungen ab und wurde deshalb für die Auswertung nicht berücksichtigt. Dieses Peptid eluiert zu einer ähnlichen Retentionszeit wie WIILGLNK, weshalb die Isolierung und Fragmentierung für beide Peptide in der linearen Ionenfalle zur gleichen Zeit erfolgen. Im Vergleich zu den einzelnen MS<sup>2</sup>-Messungen nimmt hierbei die Qualität der Messung stark ab, was auf die geringe Multiplexing-Kapazität hindeutet<sup>196</sup>.

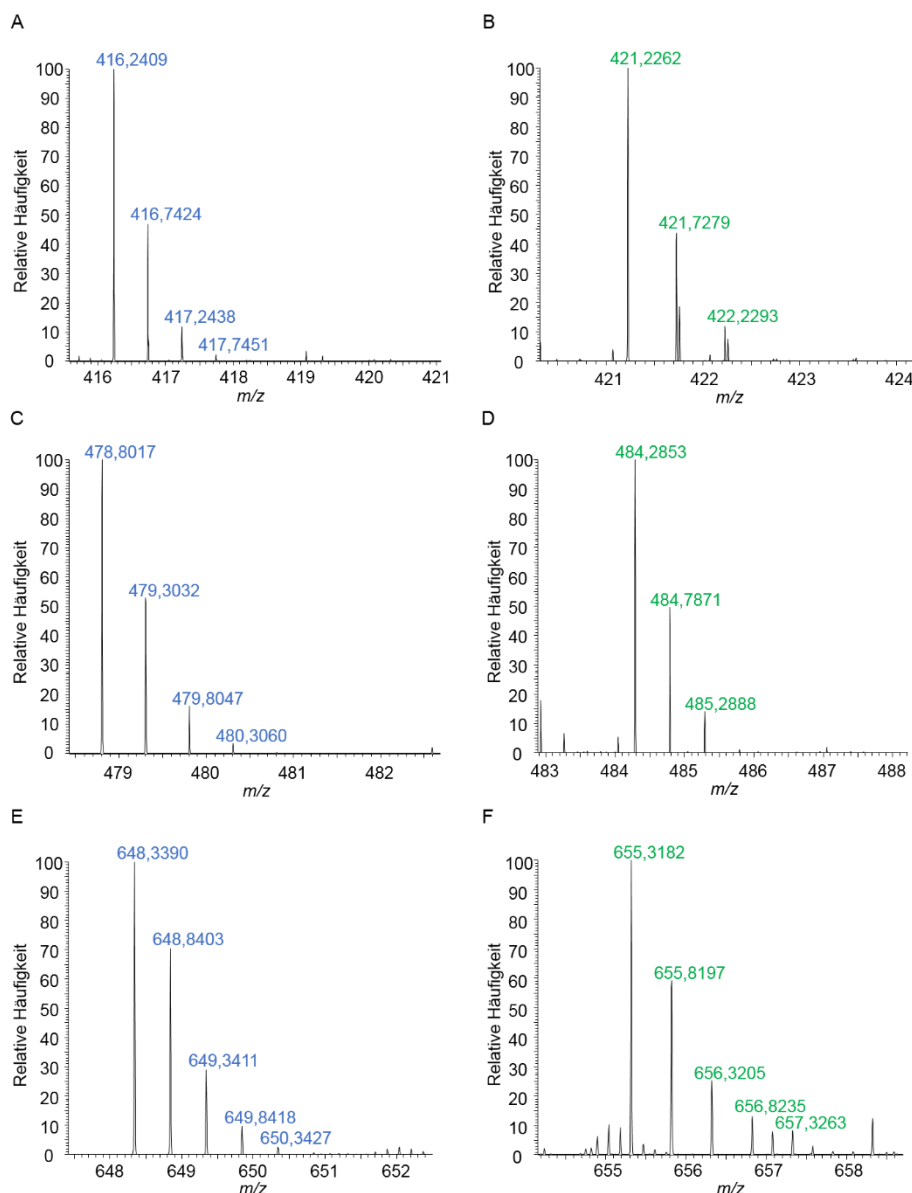
**Tabelle 12: Vergleich verschiedener Quantifizierungs-Modi für drei CAp24-Peptide an der Orbitrap Elite**

	TLNAWVK [pmol/mL]	WIILGLNK [pmol/mL]	MYSPTSILDIR [pmol/mL]	Mittelwert [pmol/mL]	StAb [pmol/mL]
MS <sup>1</sup> Scan	11,3	11,1	10,9	11,1	0,2 (1,9 %)
MS <sup>2</sup> einzeln	9,5	9,3	8,5	9,1	0,6 (6,1 %)
MS <sup>2</sup> zusammen	9,9	9,5	(2,4)	9,7	0,3 (2,7 %)

Da dieses Problem auch im Zusammenspiel der anderen Peptide aus MAP17 und p6 vermehrt aufgetreten war und alle Peptide im Idealfall in einer einzigen Messung erfasst werden sollten, wurde für die Quantifizierung der HIV-Proben auf die Precursor-basierte Quantifizierung (MS<sup>1</sup>-Scan) gesetzt. Um anhand der MS<sup>1</sup>-Massenspektren genaue quantitative Ergebnisse zu erzielen, ist es wichtig, darauf zu achten, dass die ausgewählten Precursor-Ionen keine Massen-Interferenzen mit Fremdionen aufzeigen. Dabei spielt auch die Komplexität der Probenmatrix eine wesentliche Rolle, inwieweit Molekül-Interferenzen auftreten können. Aufgrund der hohen Massenauflösung im Orbitrap Massenanalysator können Interferenzmoleküle mit kleinsten

Massenunterschieden gut erkannt werden, weshalb eine Quantifizierung über die Precursor-Ionen ausreichend sein kann.

In Abbildung 19 sind die Massenspektren der natürlichen und markierten Peptide zur C<sub>Ap</sub>24-Proteinquantifizierung und in Abbildung 20 zur M<sub>Ap</sub>17- und p6-Quantifizierung gezeigt.

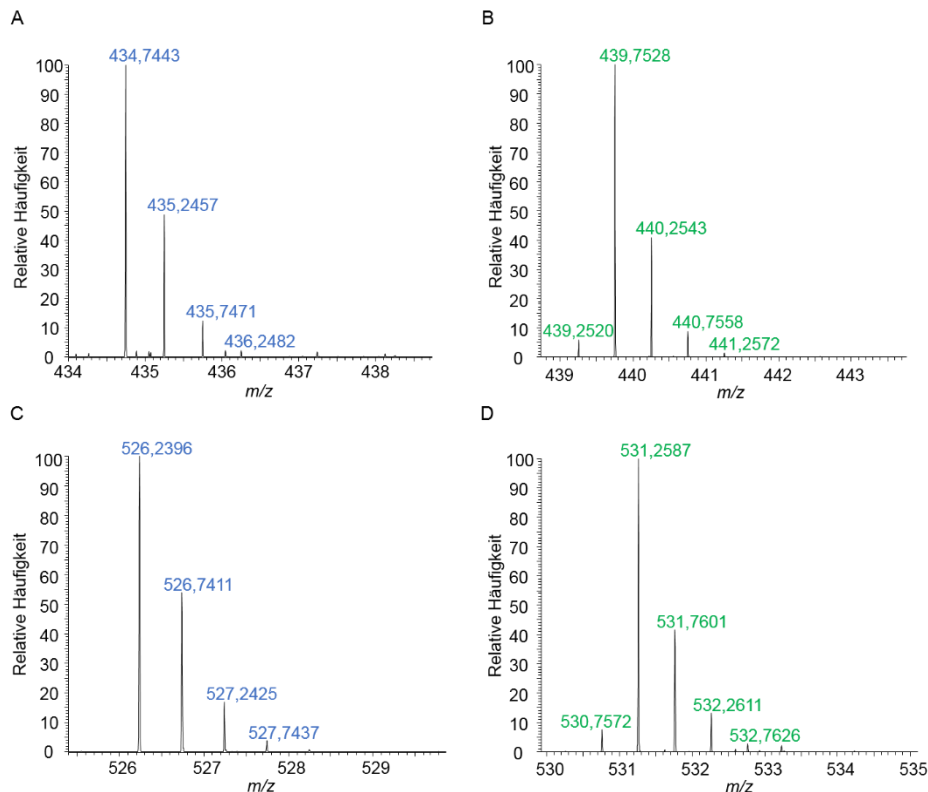


**Abbildung 19: Massenspektren der natürlichen und markierten Peptide zur C<sub>Ap</sub>24-Quantifizierung in HIV.**

Dargestellt sind die MS<sup>1</sup>-Massenspektren der natürlichen Precursor-Ionen (blau) und der isotopenmarkierten Precursor-Ionen (grün) aus dem natürlichen C<sub>Ap</sub>24 aus HIV und dem <sup>15</sup>N-markierten C<sub>Ap</sub>24-Proteinstandard für Peptid TLNAWVK (A), <sup>15</sup>N-TLNAWVK (B), WILGLNK (C), <sup>15</sup>N-WILGLNK (D), MYSPTSILDIR (E), <sup>15</sup>N-MYSPTSILDIR (F).

Anhand der Massenspektren ist zu erkennen, dass die hier verwendeten HIV-Proben eine weniger komplexe Probenmatrix aufzeigen. Die Isotopenpeaks der einzelnen natürlichen Peptide (blau) und isotopenmarkierten Analoga (grün) zeigen keine Überlappungen mit

Fremdionen mit Ausnahme des isotonenmarkierten Peptids MYSPTSILDIR (Abbildung 19/F). Dies zeigt eine Interferenz mit einem Fremdion des Ladungszustandes  $z = 7$  auf. Da das CAp24-Protein durch drei verschiedene Peptide TLNAWVK, WILLGLNK und MYSPTSILDIR vertreten wird, wurde auf eine spezifischere Quantifizierungsmethode z.B. mittels MSMS für MYSPTSILDIR verzichtet. Bei einer signifikanten Überlappung der monoisotopischen Masse des markierten Peptids MYSPTSILDIR ( $m/z = 655,32$ ) mit dem Fremdion würde das Verhältnis vom natürlichen zum markierten Peptid im Vergleich zu den anderen beiden CAp24-Peptiden niedriger ausfallen, was am Beispiel der MS<sup>1</sup>-Messung in Tabelle 12 nicht zu erkennen ist. Die Massenspektren der Peptide für die MAp17- und p6-Proteinquantifizierung (Abbildung 20) zeigen dagegen keine Interferenzen mit Fremdionen und können problemlos für die Precursor-basierte Quantifizierung genutzt werden.



**Abbildung 20: Massenspektren der natürlichen und markierten Peptide zur MAp17- und p6-Quantifizierung in HIV.**

Dargestellt sind die MS<sup>1</sup>-Massenspektren der natürlichen Precursor-Ionen (blau) und der isotonenmarkierten Precursor-Ionen (grün) vom natürlichen HIV MAp17 Peptid HIVWASR (A) und Arginin-isotonenmarkierten Peptidstandard (B) und vom natürlichen HIV p6 Peptid SLFGNDPSSQ (C) und Phenylalanin-isotonenmarkierten Peptidstandard (D).



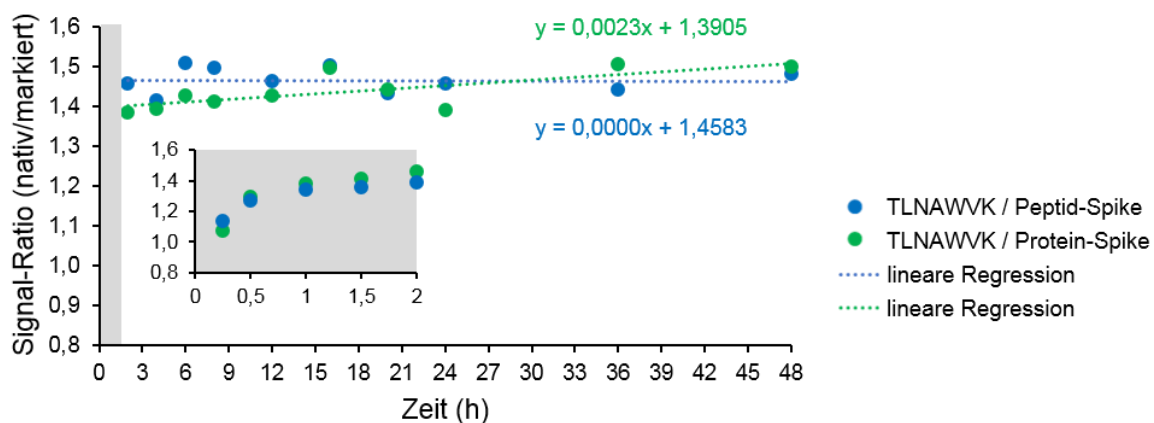
Für die HIV-Quantifizierung in komplexeren Proben-Matrices wie z.B. in humanem Blutplasma ist wahrscheinlich eine vorherige Aufreinigung der Peptide und eine gezielte MSMS-Methode für eine spezifische Peptidbestimmung essentiell. Um eine hohe Sensitivität und Selektivität zu erreichen, ist ein Messverfahren an klassischen Instrumenten für zielgerichtete Analysen wie z.B. Q Exactive besser geeignet. Für die hier verwendeten HIV-Proben reicht die Quantifizierung über die Precursor-Ionen mithilfe der Orbitrap Elite aus.

#### **4.4.2. Validierung der Proteolyse im HIV-Probenmaterial**

Vor allem bei der Verwendung von Peptid-Spikematerialien für die Proteinquantifizierung ist eine schnelle, effiziente und vollständige Proteolyse für eine genaue Proteinquantifizierung essentiell. Die Proteolyse-Kinetik wird dabei von verschiedenen Faktoren wie pH, Temperatur, Anwesenheit organischer Lösungsmittel, Trypsin-Autolyse und Proteinstruktur beeinflusst<sup>198-200</sup>. Im Fall einer unvollständigen Proteolyse der Probe führt die Quantifizierung mittels isotoopenmarkierter Peptide zu einer Unterbestimmung der Proteinkonzentration. Dagegen resultiert eine Überbestimmung der Proteinkonzentration aus einer zu langsamen Proteolyse-Kinetik, da in der Zeit, in der das natürliche Peptid aus dem Protein gebildet wird, der interne Peptid-Spike bereits durch artifizielle Modifikationen während der Probenvorbereitung an Konzentration abnimmt. Dabei spielt auch die chemische Stabilität des Peptids eine wichtige Rolle. Bei der Verwendung von isotoopenmarkierten Proteinen als interner Standard sind diese Aspekte in Bezug auf die genaue Quantifizierung weniger relevant, da davon ausgegangen wird, dass die Proteolyse-Rate und Peptidproduktion für das natürliche Protein aus der Probe sowie für den Protein-Standard gleichermaßen ablaufen sollte.

Das in dieser Arbeit genutzte Proteolyse-Protokoll für die Quantifizierung der HIV-Proben wurde hinsichtlich der Vollständigkeit der Proteolyse anhand des CAp24-Proteins überprüft. Dazu wurde zu der natürlichen HIV-Probe das <sup>15</sup>N-markierte CAp24-Protein und das Lysin-markierte CAp24-spezifische Peptid TLNAWVK hinzugefügt und proteolysiert. Abbildung 21 zeigt das Verhältnis des natürlichen TLNAWVK-Peptids aus der Probe zum <sup>15</sup>N-markierten Peptid aus dem Proteinstandard (grüne Zeitreihe) und zum Lysin-markierten Peptidstandard (blaue Zeitreihe) im zeitlichen Verlauf. Die CAp24-Proteolyse läuft für das entsprechende Peptid sehr effizient ab, da in der Zeitspanne zwischen 2 h und 48 h trotz der frischen Trypsin-Zugaben keine signifikanten Veränderungen bzw. Anstiege der Peptid-Verhältnisse zu sehen sind. Die CAp24-Proteolyse anhand des Peptids TLNAWVK scheint nach etwa 2 h bereits vollständig zu sein, da beide Zeitverläufe für Peptid- (blau) und -Proteinstandard (grün) sehr ähnlich sind. In der Anfangsphase im Bereich 0-2 h (grau hinterlegte Bereich) ist ein Anstieg der Peptid-Verhältnisse d.h. die Produktbildung zu erkennen. Entgegen der Erwartung, dass

die Peptidproduktion aus dem natürlichen und markierten Protein konform verlaufen und demnach die Verhältnisse konstant sein sollten, ist auch hier in dieser Anfangsphase ein Anstieg des Verhältnisses zu erkennen. Ein Grund könnte sein, dass das natürliche Protein und der  $^{15}\text{N}$ -markierte CAP24-Proteinstandard auch aufgrund des vorhandenen *N*-terminalen His-Tags unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstrukturen aufweisen und deshalb beide Proteine (natürlich und markiert) unterschiedliche Proteolyse-Raten aufzeigen. Deshalb ist auch für die Verwendung von Protein-Spikematerialien eine schnelle Proteolyse relevant, um Fehlerquellen für eine genaue Quantifizierung zu reduzieren. Insgesamt zeigt das Ergebnis zur CAP24-Proteolyse, dargestellt in Abbildung 21, dass die Proteolyse-Bedingungen effizient sind und zu einer vollständigen Proteolyse führen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass unter diesen Bedingungen auch eine vollständige MAP24- und p6-Proteolyse erreicht werden kann.

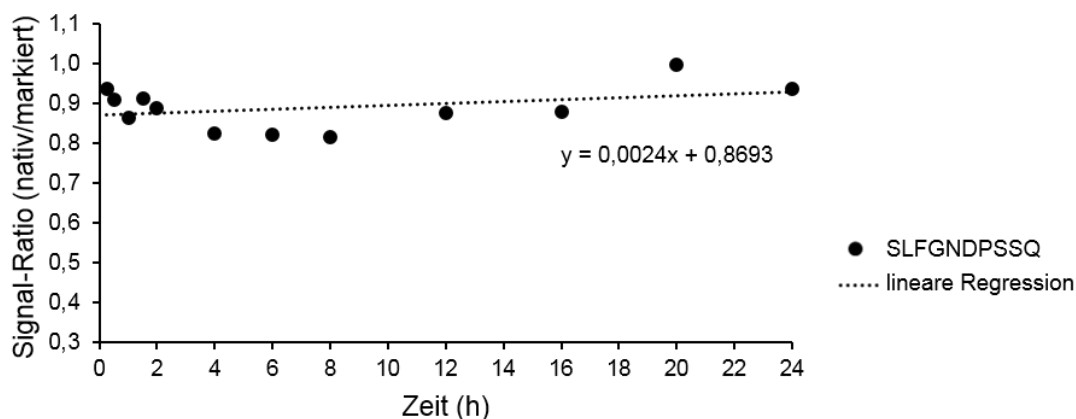


**Abbildung 21: Zeitverlauf der HIV-CAP24-Proteolyse.**

Verhältnis des natürlichen TLNAWVK-Peptids aus der CAP24-Proteolyse einer HIV-Probe zum eingesetzten  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Lysin-markierten-Peptid-Spike (blaue Datenpunkte) und zum  $^{15}\text{N}$ -markierten Peptid aus dem  $^{15}\text{N}$ -CAP24-Protein-Spike (grüne Datenpunkte) in der Zeitspanne von 0-48 h. Trypsin-Zugaben erfolgten zum Start und nach 2 h, 6 h, 12 h, und 24 h Inkubationszeit. Die grau hinterlegte Fläche zeigt die Anfangsphase der Proteolyse im Bereich 0-2 h. Bereich der Vollständigkeit der Proteolyse ist anhand der linearen Regressionsgeraden dargestellt.

Gleichermaßen wurde die Proteolyse-Kinetik des p6-Proteins mithilfe des isotopenmarkierten Peptid-Spikes SLF\*GNPSSQ in einer reellen HIV-Probe untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 gezeigt. Auch hier läuft die Proteolyse sehr effizient ab, da kein signifikanter Anstieg des Peptidverhältnisses (natürlich/markiert) anhand der Regressionsgeraden ( $m = 0,0024$ ) im Zeitraum der Datenaufnahme zwischen 15 min und 24 h zu verzeichnen ist. Die Proteolyse scheint bereits nach wenigen Minuten abgeschlossen zu sein, was vermutlich daran liegt, dass es sich um das C-terminale Peptid von p6 handelt und Trypsin nur eine Schnittstelle nutzt, um das Peptid aus dem Protein zu lösen. Die letzten Datenpunkte (36 h und 48 h) konnten aufgrund zu schwacher Signalintensitäten nicht analysiert werden. Dies

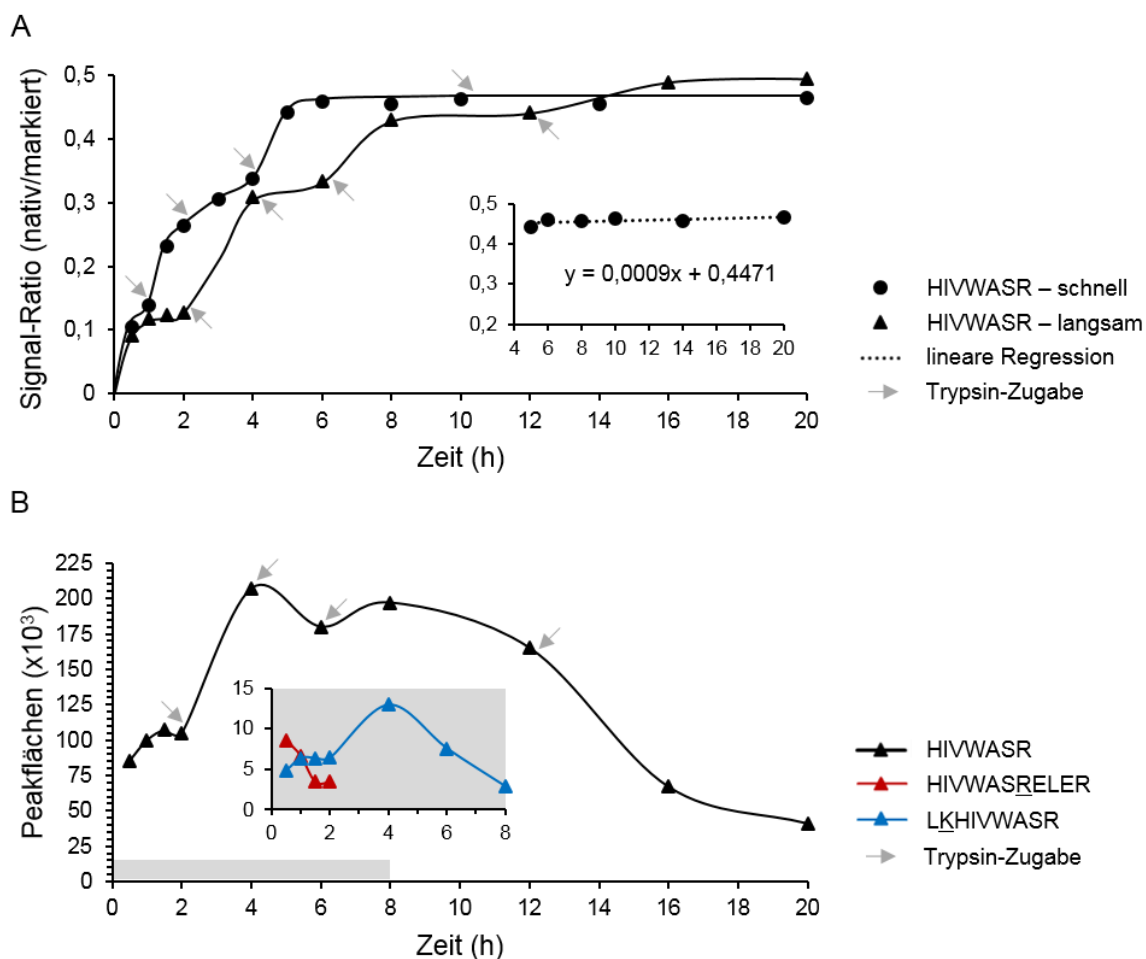
liegt zum einen daran, dass die Peptidintensitäten mit der Zeit aufgrund von artifiziellen Modifikationen abnehmen. Solche Modifikationen werden vor allem durch die Proteolyse-Bedingungen wie basisches Milieu und erhöhte Temperaturen begünstigt. Zum anderen wird die Probe im Zeitverlauf immer stärker durch die Zugabe von Trypsin und Base verdünnt, wodurch die Peptidkonzentration z.B. nach 24 h Inkubationszeit bereits um 40 % reduziert vorliegt.



**Abbildung 22: Zeitverlauf der HIV-p6-Proteolyse.**

Verhältnis des natürlichen Peptids SLFGNDPSSQ aus der p6-Proteolyse einer HIV Probe zum Phenylalanin-markierten Peptid-Spike in der Zeitspanne von 0- 24 h. Trypsin-Zugaben erfolgten zum Start und nach 2 h, 6 h, 12 h, und 24 h Inkubationszeit.

Zudem wurde die MAP17-Proteolyse in der HIV-Probe anhand des isotopenmarkierten HIVWASR\*-Peptids analysiert. Der zeitliche Verlauf der Änderung des Peptidverhältnisses aus natürlichem und markiertem Peptid ist in Abbildung 23/A dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass die Proteolyse für dieses Peptid sehr langsam abläuft (siehe Abbildung 23/A, dreieckige Datenpunkte), da mit jeder Trypsin-Zugabe nach 2 h, 4 h, 6 h und 12 h das Peptidverhältnis erneut ansteigt. Eine Vollständigkeit der Proteolyse konnte unter diesen Bedingungen nicht erreicht werden. Deshalb wurde Trypsin in kürzeren Zeitintervallen nach 1 h, 2 h, 4 h, und 10 h zur Probe hinzugefügt, wodurch eine vollständige Proteolyse schneller erreicht werden konnte (siehe Abbildung 23/A, kreisförmige Datenpunkte). Das Peptidverhältnis ändert sich nach 4-stündiger Inkubationszeit nicht mehr, auch nicht nach der Trypsin-Zugabe nach 10 h, was darauf hindeutet, dass die Proteolyse bei kürzeren Zeitintervallen der Trypsin-Zugaben nach ca. 4 h vollständig ist. Anhand des Plateau der beiden Kurvenverläufe in Abbildung 23/A ist zu sehen, dass bedingt durch Abnahme der Menge an Peptidstandard mit der Zeit bei dem langsameren Proteolyse-Protokoll (dreieckige Datenpunkte) die MAP17-Konzentration höher ausfällt als bei dem schnelleren Proteolyse-Protokoll (kreisförmige Datenpunkte).



**Abbildung 23: Zeitverlauf der HIV-MAP17-Proteolyse.**

A: Verhältnis des natürlichen Peptids HIVWASR aus der MAP17-Proteolyse einer HIV Probe zum Arginin-markierten Peptid-Spike in der Zeitspanne von 0-20 h. Langsame Proteolyse unter Trypsin-Zugaben zum Start und nach 2 h, 4 h, 6 h und 12 h Inkubationszeit (dreieckige Datenpunkte); schnellere Proteolyse unter Trypsin-Zugaben zum Start und nach 1 h, 2 h, 4 h, und 10 h Inkubationszeit (kreisförmige Datenpunkte). Das integrierte Diagramm zeigt den Bereich der Vollständigkeit der Proteolyse anhand der linearen Regressionsgeraden.

B: Änderungen der Peakflächen vom vollständig gespaltenen Peptid HIVWASR (schwarz) und von Peptidformen mit Fehlsplattungen am N-Terminus LKHIVWASR (blau) und am C-Terminus HIVWASRELER (rot) unter langsame Proteolyse-Bedingungen (dreieckige Datenpunkte).

Dieses Phänomen wurde bereits in verschiedenen Studien beobachtet<sup>151,201</sup>. Ren *et al.* konnten zeigen, dass vor allem der basische pH während der Proteolyse-Reaktion artifizielle Modifikationen wie die Desamidierung von Asparagin zu Aspartat und die N-terminale Glutamin-Zyklisierung zum  $\gamma$ -Lactam bzw. Pyroglutaminsäure (siehe Abschnitt 4.3.5, Seite 76) begünstigt<sup>202</sup>. Das Ausmaß solcher unerwünschter Nebenreaktionen ist dabei proportional zur Inkubationszeit<sup>203</sup>. Trotz der Verbesserung bezüglich der Proteolyse von MAP17, verläuft die Proteolyse im Vergleich zur CAP24- und p6-Proteolyse insgesamt langsamer ab. Das liegt vor allem an den umliegenden Sequenzmotiven des Peptids. Eine N-terminale Fehlsplattung ergibt das Peptid LKHIVWASR und eine C-terminale Fehlsplattung das Peptid HIVWASRELER.

Diese Peptide, die auch bei den Peptide-Mapping-Experimenten der HIV-Proben eindeutig identifiziert wurden (siehe Tabelle 6, Seite 56), konnten auch bei der langsameren Proteolyse-Zeitreihe (siehe Abbildung 23/A, dreieckige Datenpunkte) nachgewiesen werden. Peptide mit weiteren fehlenden Spaltungen (z. B. zwei) konnten dagegen nicht nachgewiesen werden. In Abbildung 23/B ist die Änderung der Peakflächen dieser Peptide im zeitlichen Verlauf unter den langsameren Proteolyse-Bedingungen dargestellt.

Daraus ist abzuleiten, dass das Peptid HIVWASR schneller aus dem Peptid HIVWASRELER gespalten wird als aus dem LKHIVWASR-Peptidbruchstück, da die Intensität von HIVWASRELER stetig abnimmt während die Intensität von LKHIVWASR ähnlich zu HIVWASR zunimmt. Es ist bekannt, dass saure negativ geladene Aminosäuren wie Glutaminsäure (E) und Asparaginsäure (D), die nahe an der tryptischen Schnittstelle lokalisiert sind, die Proteolyse-Effizienz aufgrund der Ausbildung von Salzbrücken im aktiven Zentrum des Enzyms reduzieren<sup>117,198,203</sup>. Slechtová *et al.* konnten zeigen, dass die Proteolyse von Schnittstellen, die C-terminal saure Aminosäuren in der Position P1' bis P2' (bezüglich der Nomenklatur nach Schlechter und Berger<sup>204</sup>) enthalten wie z.B. RE oder RTE, ca. 2-fach langsamer abläuft im Vergleich zu der eines Peptids mit einem einfachen R-Rest neben der Schnittstelle<sup>203</sup>. Dieses Sequenzmotiv ist auch im fehlgespaltenen HIVWASRELER enthalten, weshalb diese Schnittstelle womöglich etwas langsamer gespalten wird und das Peptid innerhalb von 2 h noch nachzuweisen ist.

Dagegen ist die Proteolyse-Kinetik des N-terminal fehlgespaltenen Peptids LKHIVWASR viel langsamer und zeigt in Abbildung 23/B ebenso für das vollständig gespaltene Peptid einen Kurvenverlauf der Produktbildung. Da Trypsin als Endopeptidase arbeitet, ist dieses Enzym möglicherweise weniger effizient, kurze endständige Aminosäurereste an nicht vollständig gespaltenen Peptiden abzuspalten, wie es bei LKHIVWASR der Fall ist. Nach Brownridge *et al.* hat Trypsin eher die Fähigkeit als Peptidyldipeptidase (Spaltung von Dipeptiden vom C-Terminus) zu arbeiten als als Dipeptidylpeptidase (Spaltung von Dipeptiden vom N-Terminus)<sup>117</sup>. Unter den angewandten Proteolyse-Bedingungen von Brownridge *et al.* konnten N-terminale Dipeptid-Überhänge nicht vollständig gespalten werden<sup>117</sup>.

Da aber im Beispiel für das MAP17-Peptid die N- und C-terminal fehlgespaltenen Peptide nur im langsamen Proteolyse-Protokoll (Abbildung 23, dreieckige Datenpunkte) und nicht im schnelleren Protokoll nachzuweisen sind, wird davon ausgegangen, dass die Proteolyse zumindest für das schnelle Proteolyse-Protokoll (Abbildung 23, kreisförmige Datenpunkte) vollständig verläuft. Eine weitere Überprüfung der Vollständigkeit der Proteolyse kann durch einen Vergleich mit einem weiteren MAP17-Peptid erfolgen. Dies war allerdings mit dem vorhandenen MAP17-Peptid SLYNTVATLYCVHQR leider nicht möglich, da das Peptid im

Laufe der Inkubationszeit relativ schnell nach 2 h in den HIV-Proben nicht mehr nachzuweisen war. Auch bei den quantitativen Messungen der HIV-Proben war dies der Fall.

Aufgrund der Ergebnisse wurden für die Quantifizierung der HIV-Proben die gleichen Proteolyse-Bedingungen angewandt (mit den kürzen Zeitintervallen der Trypsin-Zugaben: 1 h, 2 h, 4 h, und 10 h), um für alle Proteine CAp24, p6 und MAP17 eine vollständige Proteolyse zu erreichen.

### **4.5. ddPCR-Methodenentwicklung zur HIV-RNA-Quantifizierung**

Um die mittels IDMS quantifizierte HIV-Protein-Menge mit der RNA-Menge vergleichen zu können, wurde für die RNA-Quantifizierung ein ddPCR-Messverfahren etabliert. Die ddPCR zeigt im Vergleich zur traditionellen qPCR eine bessere Reproduzierbarkeit von Messergebnissen und ist weniger anfällig gegenüber Inhibitoren<sup>26–28</sup>. Dies beruht vor allem auf dem Prinzip des einfachen Auszählens von positiven Events nach der Amplifikation. Dennoch ist auch für die ddPCR ein sorgfältiges Assay-Design, die Validierung und Kontrolle des Verfahrens essentiell, um ein korrektes und robustes Messverfahren zu ermöglichen.

Die Quantifizierung von RNA ist mit diversen Unsicherheiten behaftet, da RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden muss. Die Effizienz der cDNA-Synthese ist dabei abhängig vom experimentellen Design, von den Reagenzien, vom verwendeten Enzym und von möglichen RNA-Sekundärstrukturen. Die Quantifizierung von RNA kann entweder als Ein-Schritt oder Zwei-Schritt-Verfahren erfolgen. Das Ein-Schritt-Verfahren bedeutet, dass die Reverse Transkription und PCR-Reaktion in einem Ansatz erfolgen, während bei dem Zwei-Schritt-Verfahren beide Reaktionen separat ablaufen. Bio-Rad bietet für die ddPCR Reagenzien für beide Verfahren an, wobei das Ein-Schritt-Verfahren bereits für HIV genutzt wurde<sup>205</sup>.

In dieser Arbeit wurde das Zwei-Schritt-Verfahren gewählt, da die Virus-Präparation und die ddPCR an verschiedenen Orten durchgeführt wurden. Im Allgemeinen ist cDNA stabiler als RNA. Deshalb wurde die cDNA für die Quantifizierung mittels ddPCR auf Trockeneis an die PTB Berlin transportiert. Die Optimierung der cDNA-Synthese, das PCR-Assay-Design und dessen Optimierung werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

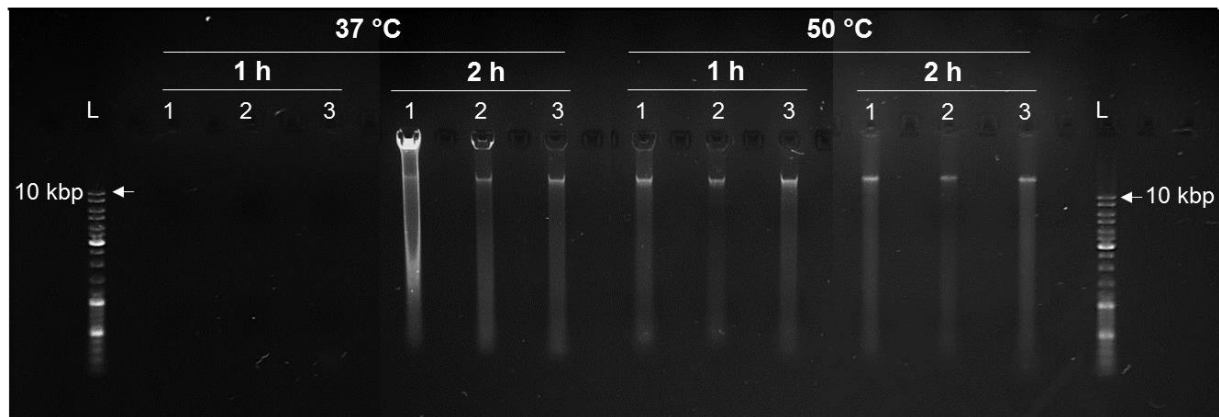
#### **4.5.1. Optimierung der cDNA-Synthese**

Für die Optimierung der cDNA-Synthese bezüglich des experimentellen Designs wurden Virusproben eingesetzt, die wie unter Abschnitt „3.1.4 Virusexpansion und Verarbeitung des HIV-Materials“ (Seite 28) beschrieben, hergestellt wurden. Um genügend Material zur Visualisierung der cDNA-Produkte im Agarosegel zu erhalten, wurden die unter Ultrazentrifugation

erhaltenen HIV-Pellets für die RNA-Extraktion eingesetzt, d.h. das Viruspellet wurde direkt in 560 µL Lysepuffer aus dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) resuspendiert und die RNA nach Protokoll (siehe Abschnitt 3.3.1 „Extraktion von viraler RNA“, Seite 31) isoliert. Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte wie unter Abschnitt 3.3.2 „cDNA-Synthese – Reverse Transkription“ (Seite 31) beschrieben.

Um das ca. 10 kb-große HIV-RNA-Genom vollständig in cDNA umschreiben zu können, wurde die MMLV (*moloney murine leukemia virus*) -Reverse Transkriptase ausgewählt, da das Enzym aufgrund der geringen RNaseH-Aktivität für die Synthese langer cDNA-Moleküle geeignet ist. Abhängig vom RNA-Molekül können für die Reverse Transkription drei verschiedene Primer-Arten verwendet werden: Oligo(dT)-Primer, Random-Primer und sequenzspezifische Primer. Oligo(dT)-Primer sind Oligonukleotide aus Thymidin-Nukleotiden, die an poly-A-enthaltende RNA binden. Dazu zählen vor allem alle eukaryotischen mRNA-Moleküle mit poly-A-Schwanz. Random-Primer sind unspezifische Oligonukleotid-Gemische aus zufälligen Basenabfolgen. Dadurch können sie jede RNA-Art erkennen, wie z.B. auch rRNAs, tRNAs oder small RNAs. Zudem können auch sequenzspezifische Primer für die cDNA-Synthese eingesetzt werden, die das Zielmolekül spezifisch erkennen. Die Oligo(dT)- und random-Primer standen im verwendeten Kit zur cDNA-Synthese zur Verfügung. Als HIV-sequenzspezifischer Primer wurde der „LTR-fulllength-as-Primer“<sup>206,207</sup> (Sequenz siehe Tabelle 27, Seite 127), der spezifisch in der 3'-LTR-Region bindet, getestet. Für die Optimierung der Reaktionsbedingungen der cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg extrahierte RNA eingesetzt. Die Ergebnisse zur Syntheseoptimierung sind in Abbildung 24 zusammengestellt. Der Kit-Hersteller empfiehlt Synthesebedingungen bei 37 °C für 1 h. Allerdings konnte unter diesen Bedingungen kein Produkt nach der cDNA-Synthese im Agarosegel nachgewiesen werden. Erst bei einer zwei-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C ist für alle drei Primer-Arten ein Produkt bei knapp >10 kbp detektierbar. Dabei ist vor allem für den Oligo(dT)-Primer ein Banden-Schmier zu sehen. Ein Grund dafür könnte sein, dass vor allem virale Genome dazu neigen RNA-Sekundärstrukturen auszubilden, die eine effektive cDNA-Synthese behindern können. Deshalb ist die Synthese bei höheren Temperaturen womöglich effektiver, da Sekundärstrukturen gelöst werden und Primer besser an ihren Zielsequenzen binden können. Deshalb wurde die Synthese bei 50 °C für 1 h und 2 h getestet. Bereits nach einstündiger Inkubation bei 50 °C sind Produktbanden bei >10 kbp bei allen drei Primern zu erkennen. Die Menge an cDNA verändert sich nach zweistündiger Inkubation bei 50 °C nicht wesentlich. Die cDNA-Synthese scheint bei 50 °C effektiver abzulaufen, da vermutlich Sekundärstrukturen der RNA bei 37 °C noch relativ stabil sind<sup>206</sup>. Um eine effiziente cDNA-Synthese zu gewährleisten, wurden für die quantitativen Analysen folgende Bedingungen gewählt: 50 °C für 2 h. Zudem wurde der sequenzspezifische Primer „LTR-fulllength-as“ in der Endkonzentration 0,8 µM

eingesetzt, da er HIV-spezifisch ist und als Subtyp-generisch etabliert wurde, was bedeutet, dass ein weites HIV-Spektrum erkannt werden kann<sup>206,207</sup>.



**Abbildung 24: Optimierung der cDNA-Synthesebedingungen**

Für die Analyse wurden jeweils 500 ng cDNA auf ein 0,8 %iges Agarose-Gel aufgetragen und drei verschiedene RT-Primer wurden getestet: Oligo(dT) (1), Random 9-mer (2), sequenzspezifischer Primer „LTR-fulllength-as“ (3). Größenmarker: GeneRuler DNA Ladder Mix (L).

Wie in Abbildung 24 ersichtlich, weist die cDNA im Agarose-Gel eine Größe >10 kbp auf. Es ist möglich, dass die virale cDNA im Vergleich zum mitgeführten Größenstandard ein anderes Laufverhalten zeigt, da ein produzierter HIV-cDNA-Einzelstrang etwa 10 kb groß ist, während der Größenstandard in Basenpaaren (Doppelstrang) angegeben wird. Eine andere Erklärung ist, dass nach der cDNA-Synthese stabile RNA-DNA-Hybride vorliegen, die ebenfalls ein anderes Laufverhalten zeigen als DNA-Doppelstränge.

#### 4.5.2. Primer- und Assay Design

Für die Quantifizierung der HIV-cDNA wurde in dieser Arbeit ein Taq Man-basierter Assay entwickelt, der spezifisch den HIV *gag*-Genombereich nachweist. Vergleichend wurde ein weiteres Primer-Sonden-Paar aus der Literatur ausgewählt, welches den *pol*-Genombereich detektiert<sup>30</sup>. In Tabelle 27 (Anhang, Seite 127) sind alle Sequenzen der eingesetzten Primer und Sonden aufgelistet. Für den *gag*-spezifischen Taq Man Assay wurde anhand der HIV-Sequenzanalyse in der Los Alamos-HIV-Sequenzdatenbank ein konservierter Sequenzabschnitt aus dem *gag*-Genombereich ausgewählt und ein Primer-Sonden-Paar mit Hilfe des Programms „Primer Quest Tools“ (IDT) entwickelt. Dieses Programm berücksichtigt automatisch bestimmte Kriterien, die für einen optimalen Assayverlauf erforderlich sind. Demnach sollten die Primer so an die Zielsequenz binden, dass eine Amplikon-Länge zwischen 75-150 bp entsteht. Die Primer-Länge sollte zwischen 18 und 30 Nukleotide betragen und der GC-Gehalt zwischen 20 % und 80 % liegen, wobei 50 % als ideal angenommen werden.



Zudem sollten die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Primer nahezu identisch sein. Die spezifischen Sonden wurden als „*double quenched* Sonden“ (IDT) eingesetzt. Diese reduzieren vor allem Hintergrundsignale, da zwei Quencher-Moleküle das emittierte Licht des Fluorophors absorbieren. Dadurch werden die End-Punkt-Fluoreszenzsignale und damit die Sensitivität des Assays im Vergleich zu einfachen Quenchern erhöht. Die Sonden besitzen am 5'-Ende den Fluorophor Fluorescein (56-FAM), einen internen Dark-Quencher (ZEN) und am 3'-Ende einen Iowa Black Quencher. Die Sonde sollte möglichst in der Nähe des 3'-Endes des Primers binden und 20-30 Nukleotide lang sein. Der GC-Gehalt der Sonde sollte zwischen 40-60 % betragen und idealerweise etwas größer sein als bei den Primern. Ebenso sollte die Schmelztemperatur der Sonde etwa 5-10 °C über der Schmelztemperatur der Primer liegen.

Weiterhin können Sekundärstrukturen (DNA-Hairpin-Strukturen) und komplementäre Sequenzbereiche zwischen Primer und Sonden die PCR-Effizienz beeinflussen und sollten wenn möglich vermieden bzw. reduziert werden. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, sollten vor allem Poly-Basenabfolgen vermieden werden und Komplementaritäten am 3'-Ende, da diese vor allem die Bildung von Oligonukleotid-Dimeren begünstigen. Alle aufgezählten Parameter wurden mit Hilfe des frei nutzbaren Internetprogramms „Primer Quest Tools“ (IDT) für beide Primer- und Sonden-Paare analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13: Eigenschaften von Primern und Sonden**

Oligo-nukleotid	Länge [bp]	$T_m$ [°C]	GC-Gehalt [%]	Hairpin	Self-Dimere	3'-Komplementarität
<i>pol</i> -Genombereich – Amplikonlänge: 127 bp						
Pol-s	27	64,1	33,3	8	6	4
Pol-as	29	60,6	20,7	9	6	0
Pol-Sonde	19	67,2	57,9	2	4	4
<i>gag</i> -Genombereich – Amplikonlänge: 122 bp						
Gag-s	21	64,0	47,6	1	6	0
Gag-as	23	63,9	43,5	5	4	2
Gag-Sonde	24	69,9	50,0	1	6	0

Für beide Primer-Sonden-Sets liegt die jeweilige Amplikon-Länge mit 127 bp für *pol* und 122 bp für *gag* sowie die Primer- und Sonden-Länge im nahezu optimalen Bereich. Da die Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden abhängig von der Elektrolytkonzentration im Reaktionsmix sind, wurden diese anhand der Zusammensetzungen des PrimeTime Gene Ex-

pression Master Mix von IDT (50 mM Na<sup>+</sup>, 3 mM Mg<sup>2+</sup> und 0,8 mM dNTPs) bei einer Oligonukleotid-Konzentration von 1 µM mit dem OligoAnalyzer 3.1 (IDT) kalkuliert. Dieser PCR-Mix wurde auch für die Assay-Optimierung auf dem qPCR-System verwendet. Darauf basierend wurde das *gag*-Primer-Sonden-Set so erstellt, dass die gewünschten Kriterien wie z.B. identische Schmelztemperaturen der beiden Primer und um 6 °C höhere Schmelztemperatur der Sonde erfüllt sind (siehe Tabelle 13). Auch der GC-Gehalt liegt ausreichend hoch, um eine entsprechende Stabilität der *gag*-Oligonukleotide sicherzustellen.

Dagegen variieren die Schmelztemperaturen des *pol*-Primer-Sets<sup>30</sup> stärker und auch der GC-Gehalt ist mit lediglich 21 % und 33 % eher niedrig. Beide Primer-Sonden-Sets zeigen eine relativ große Neigung zu Sekundärstrukturen und Primer-Dimeren, wobei der Anteil für den *pol*-Assay im Vergleich zum *gag*-Assay noch höher liegt (siehe Tabelle 13).

Die HIV-Spezifität der entsprechenden Oligonukleotide wurde mit dem NCBI/Primer-BLAST-Tool überprüft. Die Primer- sowie Sonden-Sequenzen wurden dabei gegen die Refseq mRNA (Homo sapiens) Datenbank analysiert. Das *pol*-Primer-Set<sup>30</sup> ist spezifisch für HIV und weist keine weiteren Bindungsstellen auf. Im Gegensatz dazu besitzt der *gag*-sense-Primer eine Bindungsstelle bei gleich zwei Genen (KIAA2026 und NCAM2) und der *gag*-antisense-Primer immerhin noch an einem Gen (NCAM2). Dementsprechend könnten die *gag*-Primer neben der HIV-Sequenz auch mit den genannten Bindungsstellen interagieren. Allerdings ist die *gag*-Sonde HIV-spezifisch, so dass eine unspezifische Fluoreszenz sehr unwahrscheinlich ist. Die Optimierung der einzelnen Assay-Parameter wird im nächsten Abschnitt näher diskutiert.

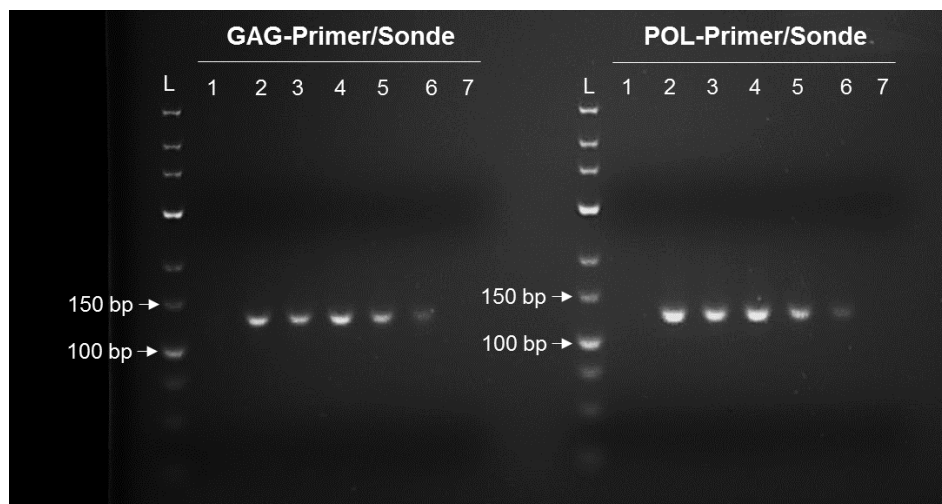
### 4.5.3. Optimierung der Assay-Parameter

Die erste Protokoll-Optimierung wurde am qPCR-Gerät Rotor-Gene Q von Qiagen unter Verwendung des Kits „PrimeTime Gene Expression Master Mix (IDT Inc.)“ durchgeführt. Für die erste Testung des *pol*- und *gag*-Assays wurden HIV-cDNA-Mengen zwischen 3 pg und 100 ng eingesetzt. Die DNA-Amplifikation verlief unter diesen Synthesebedingungen für beide Assays erfolgreich, was anhand der aufgezeichneten Amplifikationskurven ersichtlich war. Tabelle 14 zeigt die ermittelten C<sub>T</sub>-Werte (*cycle threshold*) für beide Assays. Die C<sub>T</sub>-Werte nehmen, wie erwartet, mit der Abnahme der cDNA-Konzentration zu, da für niedrigere cDNA-Konzentrationen mehr PCR-Zyklen benötigt werden bis das Amplifikationsprodukt nachweisbar wird. Beide Assays können den Konzentrationsbereich erfassen, wobei der C<sub>T</sub>-Wert für 100 ng DNA bei dem *pol*-Assay abweicht. Unterschiede zwischen beiden Assays zeigen sich vor allem bei niedrigen DNA-Mengen (10 pg und 1 pg HIV cDNA).

Tabelle 14: C<sub>T</sub>-Werte der cDNA-Konzentrationsreihe für gag- und pol-Assay

Menge HIV cDNA	C <sub>T</sub> -Werte	
	Gag-Primer	Pol-Primer
100 ng	15,78	23,82
10 ng	17,86	17,78
1 ng	21,69	21,39
100 pg	24,56	24,38
10 pg	29,05	28,07
1 pg	33,00	31,28
negativ	-	-

Nach der PCR-Reaktion wurde die amplifizierte DNA zur Überprüfung der Produktgrößen und zum Ausschluss möglicher Nebenprodukte zusätzlich qualitativ auf einem Agarosegel analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt. Anhand des mitgeführten Größenstandards wird ersichtlich, dass die Größe der Amplifikationsprodukte zwischen 100 und 150 bp liegt, was den erwarteten Amplikongrößen von 127 bp für das *pol*-Set und 122 bp für das *gag*-Set entspricht. Nebenprodukte sind für beide Assays nicht ersichtlich. Auch der *gag*-Assay, der theoretisch Gene aus dem humanen Genom erkennen kann, zeigte keine Nebenprodukte.

Abbildung 25: Überprüfung der DNA-Produktgrößen mit *gag*- und *pol*-PCR-Assay.

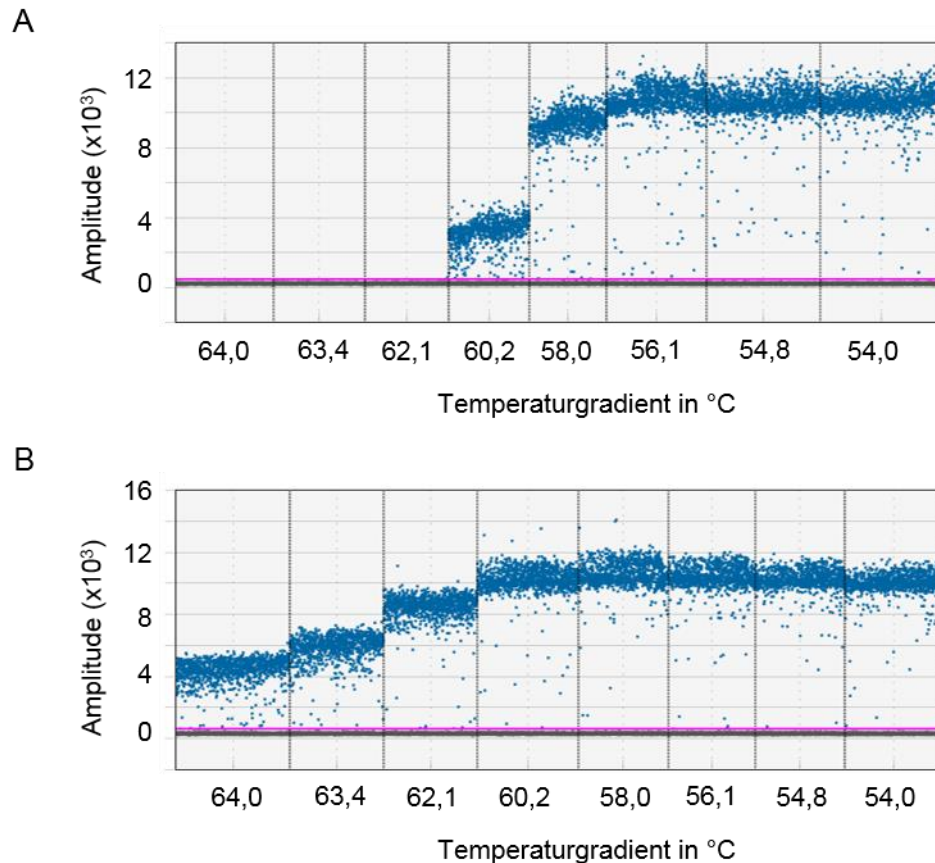
Für die Analyse wurden jeweils 500 ng DNA auf ein 0,8 %iges Agarose-Gel eingesetzt. 100 ng cDNA (1), 10 ng cDNA (2), 1 ng cDNA (3), 0,1 ng cDNA (4), 0,01 ng cDNA (5), 0,001 ng cDNA (6), Negativkontrolle (7), Größenmarker: GeneRuler DNA Ladder Mix (L)

Die optimale Primer- und Sonden-Konzentration scheint für beide Assays ähnlich zu sein. Je höher die Primer- und Sonden-Konzentration ist, desto höher fällt das Fluoreszenzsignal aus. Die getesteten Konzentrationen wurden entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Ein Beispiel für den *gag*-Assay ist in Tabelle 15 gezeigt. Anhand der Ergebnisse wurde für alle quantitativen Analysen eine Primer-Konzentration von 0,9  $\mu\text{M}$  und eine Sonden-Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

**Tabelle 15: Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration am Beispiel des *gag*-Assays**

c (Primer) [ $\mu\text{M}$ ]	c (Sonde) [ $\mu\text{M}$ ]	C <sub>T</sub> -Werte	Fluoreszenz- Intensität
0,5	0,2	21,39	~ 10
0,9	0,15	20,91	~ 20
0,9	0,2	20,35	~ 50
0,9	0,25	19,64	~ 75

Diese mittels qPCR optimierten PCR-Parameter wurden anschließend auf das ddPCR QX200 System übertragen und validiert: die Primer-Konzentrationen von 0,9  $\mu\text{M}$ , die Sonden-Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  und das PCR-Programm (siehe Seite 33). Um die optimale Annealing-Temperatur bei der gewählten Anzahl an PCR-Zyklen zu finden, wurde der C1000 Touch Cycler (Bio-Rad) verwendet und ein Temperaturgradient zwischen 54 °C und 64 °C (64; 63,4; 62,1; 60,2; 58; 56,1; 54,8; 54 °C) getestet. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis für den *pol*-Assay<sup>30</sup> (A) und für den *gag*-Assay (B). Basierend auf der größtmöglichen Differenz der Fluoreszenz-Amplituden zwischen positiven und negativen Tröpfchen wurde die optimale Annealing-Temperatur bei 45 PCR-Zyklen ermittelt. Diese beträgt für den *pol*-Assay 56 °C und für den *gag*-Assay 58 °C. Die Annealing-Temperatur von 56 °C für den *pol*-Assay weicht leicht von der in der Literatur<sup>30</sup> angegebenen Temperatur von 58 °C ab, was auf leicht abweichende PCR-Bedingungen bei der ddPCR zurückzuführen ist.

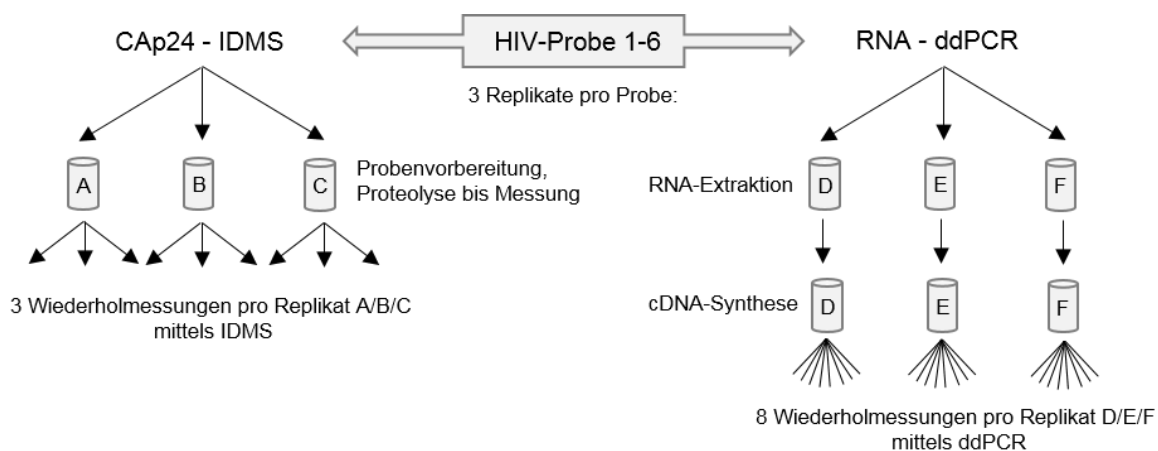


**Abbildung 26: Temperaturgradient zur Optimierung der Annealing-Temperatur für pol (A)- und gag (B)**

Beide Assays wurden quantitativ verglichen, um einen Trend bezüglich der Richtigkeit der ddPCR-Methoden erkennbar zu machen. Dazu wurde eine HIV-cDNA-Probe zweifach mit dem jeweiligen Assay quantifiziert. Beide Assays liefern sehr ähnliche quantitative Ergebnisse mit geringen Abweichungen:  $120 \pm 2,94$  Kopien/ $\mu\text{L}$  (*pol*-Assay) und  $124 \pm 4,93$  Kopien/ $\mu\text{L}$  (*gag*-Assay). Dies bedeutet, dass das etablierte *gag*-ddPCR-Verfahren für die Quantifizierung der hier genutzten HIV-Variante vergleichbar gut geeignet ist, wie der *pol*-Assay von Strain *et al.*<sup>30</sup>. Da die quantitativen Ergebnisse für beide Assays sehr ähnlich sind, trägt die biologische Varianz nicht wesentlich zur Messunsicherheit bei. Die Präzision der Messmethode und des kompletten Analysenverfahrens zur HIV-RNA-Quantifizierung wird vergleichend zum IDMS-Verfahren im nächsten Abschnitt diskutiert.

#### 4.6. Präzision des IDMS- und ddPCR-Verfahrens

Die Präzision eines Analysenverfahrens bezeichnet die statistische Variation der Analysenergebnisse. Sie wurde bezüglich der HIV-RNA-Quantifizierung mittels ddPCR und Protein-Quantifizierung mittels IDMS anhand von Wiederholungs- und Vergleichsmessungen ermittelt. Für diese Analysen wurden sechs unabhängige Virus-Proben in Zellkultur hergestellt. Ein Schema zum experimentellen Vorgehen und zum Aufbau der Wiederholungsmessungen ist in Abbildung 27 dargestellt. Von jeder einzelnen HIV-Probe wurden jeweils drei Aliquote (Replikate) mittels IDMS (A/B/C) und ddPCR (D/E/F) gemessen. Damit wird die Präzision des Analysenverfahrens bzw. die Reproduzierbarkeit durch die wiederholte Komplettanalyse unter Wiederholungsbedingungen bestimmt. Wiederholungsbedingungen bedeutet in diesem Fall gleiches Messverfahren, gleiche Operateurin, gleiches Messsystem, gleiche Messbedingungen, gleicher Laborstandort. Die drei Replikate pro Probe wurden jeweils an verschiedenen Tagen bearbeitet und gemessen. Die wiederholte Messung von ein und derselben Probe (Wiederholungsmessungen der einzelnen Replikate) beschreibt die technische Präzision des Messverfahrens.



**Abbildung 27: Übersicht zum experimentellen Vorgehen für den quantitativen Protein-RNA-Vergleich**

Für die Quantifizierung des CAp24-Proteins aus den sechs präparierten HIV-Suspensionen wurde der  $^{15}\text{N}$ -markierte CAp24-Protein-Spike verwendet. Von jeder Probe wurden drei unabhängige Replikate (A/B/C) unter Anwendung aller analytischer Methodenschritte jeweils dreimal massenspektrometrisch gemessen.

Bezüglich der RNA-Quantifizierung wurde die RNA aus drei Aliquoten (D/E/F) jeder HIV-Probe extrahiert und jeweils daraus einmal die cDNA synthetisiert. Die cDNA jedes Replikats wurde für die ddPCR-Messung eingesetzt und achtmal mit dem „QX200 Droplet Digital System“ (Bio-Rad) gemessen, um die Cartridge optimal zu nutzen. In Tabelle 16 sind die Messergebnisse

von allen gemessenen Aliquoten jeder Probe und die entsprechende Standardabweichung des Mittelwerts  $u(\bar{x})$  aufgelistet. Die  $u(\bar{x})$ -Werte in Tabelle 16 beschreiben die technischen Varianzen bzw. die Präzision der Messverfahren IDMS und ddPCR (Wiederholungsmessungen der einzelnen Replikate).

**Tabelle 16: Messergebnisse der HIV-Cap24 und -RNA Quantifizierung und Wiederholpräzision**

Probe	CAp24 - IDMS			RNA - ddPCR		
	Replikat A	Replikat B	Replikat C	Replikat D	Replikat E	Replikat F
1	pmol/g	30,4 ± 0,8	26,7 ± 0,5	29,8 ± 1,1	-	-
	Kopien/g	1,83x10 <sup>13</sup>	1,61x10 <sup>13</sup>	1,80x10 <sup>13</sup>	3,78x10 <sup>7</sup> ± 5,59x10 <sup>5</sup>	2,61x10 <sup>7</sup> ± 2,15x10 <sup>5</sup>
	$u(\bar{x})$ in %	2,5	1,7	3,7	1,5	0,8
2	pmol/g	88,8 ± 3,9	79,1 ± 1,8	82,9 ± 1,6	-	-
	Kopien/g	5,35x10 <sup>13</sup>	4,79x10 <sup>13</sup>	4,99x10 <sup>13</sup>	2,17x10 <sup>8</sup> ± 1,13x10 <sup>6</sup>	1,34x10 <sup>8</sup> ± 9,43x10 <sup>5</sup>
	$u(\bar{x})$ in %	4,3	2,3	1,9	0,5	0,7
3	pmol/g	123,6 ± 4,2	113,8 ± 1,0	121,1 ± 2,3	-	-
	Kopien/g	7,44x10 <sup>13</sup>	6,85x10 <sup>13</sup>	7,30x10 <sup>13</sup>	2,35x10 <sup>8</sup> ± 7,07x10 <sup>5</sup>	2,03x10 <sup>8</sup> ± 1,43x10 <sup>6</sup>
	$u(\bar{x})$ in %	3,4	0,9	1,9	0,3	0,7
4	pmol/g	137,7 ± 4,5	137,6 ± 1,4	150,7 ± 2,4	-	-
	Kopien/g	8,29x10 <sup>13</sup>	8,29x10 <sup>13</sup>	9,08x10 <sup>13</sup>	2,76x10 <sup>8</sup> ± 1,02x10 <sup>6</sup>	3,87x10 <sup>8</sup> ± 2,63x10 <sup>6</sup>
	$u(\bar{x})$ in %	3,5	1,0	1,6	0,4	0,7
5	pmol/g	169,6 ± 8,7	143,8 ± 3,3	160,1 ± 1,7	-	-
	Kopien/g	1,02x10 <sup>14</sup>	8,66x10 <sup>13</sup>	9,64x10 <sup>13</sup>	4,23x10 <sup>8</sup> ± 3,89x10 <sup>6</sup>	5,69x10 <sup>8</sup> ± 4,92x10 <sup>6</sup>
	$u(\bar{x})$ in %	5,1	2,3	1,1	0,9	0,9
6	pmol/g	186,2 ± 9,3	170,6 ± 3,4	179,0 ± 2,6	-	-
	Kopien/g	1,12 x 10 <sup>14</sup>	1,03 x 10 <sup>14</sup>	1,08 x 10 <sup>14</sup>	6,42x10 <sup>8</sup> ± 4,34x10 <sup>6</sup>	1,24x10 <sup>9</sup> ± 8,27x10 <sup>6</sup>
	$u(\bar{x})$ in %	5,0	2,0	1,4	0,7	0,7

Die technische Varianz der ddPCR bezüglich der HIV-RNA-Messung ist, wie in Tabelle 16 zu erkennen, sehr gering. Die ddPCR ist bekannt für ihre technische Reproduzierbarkeit und Robustheit<sup>34</sup>. Dies beruht vor allem auf dem Messprinzip der ddPCR: Auszählen der positiven Tröpfchen bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit gegenüber Inhibitoren. Die technische Varianz der IDMS-Methode fällt dagegen stärker aus (siehe Tabelle 16). Der größte Anteil der Unsicherheit liegt dabei nicht zwischen den einzelnen drei Wiederholungsmessungen der Replikate, sondern zwischen den einzelnen CAp24-Peptiden (TLNAWVK, WIILGLNK, MYSPTSILDIR), die zur Quantifizierung herangezogen wurden. Diesbezüglich ist zu berücksichtigen, dass die biologische Varianz aufgrund der drei verschiedenen CAp24-Peptide bei der IDMS im Gegensatz zur ddPCR stärker zur Unsicherheit beiträgt. Auch Matrix-Effekte könnten die IDMS-Messung beeinflussen, da die präparierten Protein-Proben direkt für die IDMS-Messung eingesetzt wurden. Dies könnte erklären, weshalb die Varianz der IDMS zwischen den Replikaten insgesamt stärker variiert als bei der ddPCR. Eventuell könnte diese Varianz der IDMS reduziert werden, indem die zu analysierenden Peptide vor der LC-ESI-MS-Messung von der komplexen Probenmatrix z.B. chromatographisch mittels SCX abgetrennt werden. Die Probenmatrix in den cDNA-Proben ist weniger komplex, da die Proben durch die RNA-Extraktion von unerwünschten Bestandteilen wie z.B. Proteinen gereinigt werden. Im Durchschnitt beträgt die technische Varianz der IDMS 2,5 % und der ddPCR 0,7 %.

In Tabelle 17 sind die quantitativen Werte der HIV-Proben 1-6 bezüglich der CAp24- und RNA-Menge, die alle drei Replikate beinhalten, aufgelistet. Die Werte für  $u(\bar{x})$  beschreiben demnach die Präzision des gesamten Analysenverfahrens bzw. die Reproduzierbarkeit. Wie in Tabelle 17 ersichtlich, fällt die Varianz der wiederholten Komplettanalyse für die IDMS im Durchschnitt mit 2 % niedriger aus als für die ddPCR mit 3,8 %. Die Präzision des gesamten Analysenverfahrens ist für die IDMS größer, da hier aufgrund der Isotopenverdünnung eine interne Standardisierung vorgenommen wurde. Die Wiederfindungsrate oder der Probenverlust während der Probenvorbereitung spielt deshalb eine untergeordnete Rolle bezüglich der Messunsicherheit. Für die ddPCR ist diese interne Standardisierung während des gesamten Analysenverfahrens nicht möglich, so dass hier die Präzision schlechter ausfällt, da vor allem Probenverluste während der Probenvorbereitung zur Variation beitragen. Insbesondere die Effizienz der RNA-Extraktion und cDNA-Synthese spielt für die beobachtete Variation eine wesentliche Rolle<sup>34,208</sup>.



Tabelle 17: Vergleich der HIV-CAP24 und -RNA-Quantität von sechs HIV-Proben

Probe		CAP24	RNA
1	pmol/g	$29,0 \pm 0,7$	-
	Kopien/g	$1,75 \times 10^{13} \pm 4,27 \times 10^{12}$	$3,31 \times 10^7 \pm 1,07 \times 10^6$
	u( $\bar{x}$ ) in %	2,4	3,3
2	pmol/g	$83,6 \pm 1,7$	-
	Kopien/g	$5,03 \times 10^{13} \pm 1,04 \times 10^{12}$	$1,66 \times 10^8 \pm 7,63 \times 10^6$
	u( $\bar{x}$ ) in %	2,1	4,6
3	pmol/g	$119,5 \pm 1,8$	-
	Kopien/g	$7,20 \times 10^{13} \pm 1,10 \times 10^{12}$	$2,09 \times 10^8 \pm 4,19 \times 10^6$
	u( $\bar{x}$ ) in %	1,5	2,0
4	pmol/g	$142,0 \pm 2,2$	-
	Kopien/g	$8,55 \times 10^{13} \pm 1,35 \times 10^{12}$	$2,97 \times 10^8 \pm 1,39 \times 10^7$
	u( $\bar{x}$ ) in %	1,6	4,7
5	pmol/g	$157,8 \pm 3,9$	-
	Kopien/g	$9,50 \times 10^{13} \pm 2,37 \times 10^{12}$	$4,90 \times 10^8 \pm 1,28 \times 10^7$
	u( $\bar{x}$ ) in %	2,5	2,6
6	pmol/g	$178,6 \pm 3,6$	-
	Kopien/g	$1,08 \times 10^{14} \pm 2,14 \times 10^{12}$	$9,19 \times 10^8 \pm 5,12 \times 10^7$
	u( $\bar{x}$ ) in %	2,0	5,6

#### 4.7. Analyse der Gag-Polyprotein-Stöchiometrie

Die Stöchiometrie der einzelnen Gag-Strukturproteine MAp17, CAp24 und p6 wurde massenspektrometrisch überprüft. Die molaren Verhältnisse sollten theoretisch 1:1 sein, unter der Annahme, dass alle Proteine aus jeweils einem Vorläuferprotein GAGp55 stammen. Dazu wurden fünf unabhängige HIV-Proben analysiert und für die Quantifizierung die entsprechenden isotope markierten Standards  $^{15}\text{N}$ -CAp24-Protein, MAp17-Peptid HIVWASR( $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ ) und p6-Peptid SLF( $^{13}\text{C}_9^{15}\text{N}$ )GNPSSQ äquimolar zum Probenmaterial hinzugegeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgelistet.

**Tabelle 18: Ergebnisse zur Proteinstöchiometrie von MAp17, CAp24 und p6**

HIV Nr.:	Verhältnis der Peak-Flächen der Peptide (natürlichen/markiert)			prozentualer Anteil der Peak-Flächen- Verhältnisse zu CAp24	
	CAp24*	MAp17	p6	MAp17 [%]	p6 [%]
1	0,50 ± 0,01	0,44	0,34	88,0	68,0
2	1,11 ± 0,02	0,93	0,71	83,8	64,0
3	0,58 ± 0,02	0,43	0,38	74,1	65,5
4	0,64 ± 0,015	0,46	0,44	71,9	68,8
5	0,53 ± 0,015	0,45	0,38	84,9	71,7
gesamt	-	-	-	<b>80,5 ± 7,1</b>	<b>67,6 ± 3,0</b>

\*CAp24 bestimmt anhand der Peptide TLNAWVK, WIILGLNK, MYSPTSILDIR

Anhand der ermittelten Verhältnisse aus den Peak-Flächen der natürlichen und markierten Peptide, die äquimolar zu den Proben zugesetzt wurden, wird ersichtlich, dass das Verhältnis von MAp17 und p6 im Vergleich zu CAp24 geringer ausfällt. Im Durchschnitt beträgt der prozentuale Anteil von MAp17  $80,5 \pm 7,1$  % und von p6  $67,6 \pm 3,0$  % bezogen auf 100 % CAp24. Ein Grund für die reduzierte Menge an p6 im Vergleich zu CAp24 könnte die ribosomale Leserahmenverschiebung (*Frameshift*) sein, die in der Sp2-kodierenden Region an der Aminosäureposition 435 (siehe Abbildung 12, Seite 55) stattfindet, wodurch bei der Gag-Pol-Polyprotein-Synthese Pol-spezifisches p6 (abgekürzt p6\*) entsteht<sup>209,210</sup>. Es wird vermutet, dass p6\* aus Pol an der Aktivierung der Protease beteiligt ist und eine zu frühe Virus-Prozessierung verhindert<sup>211,212</sup>. Die Effizienz der Leserahmenverschiebung wird in der Literatur mit einer Häufigkeit von ca. 5-10 % angegeben<sup>58,210</sup>. Das typische Verfahren, das eingesetzt wird, um die Effizienz der Leserahmenverschiebung zu bestimmen, ist der duale Luciferase-Assay – ein Reportersystem. Dabei wird eine kurze *gag-pol*-Teilsequenz, die die *Frameshift*-Position beinhaltet, zwischen den Genen von zwei verschiedenen Luciferase-Enzymen aus *renilla*

(Korallenart) und *firefly* (Glühwürmchen) inseriert<sup>213</sup>. Die Synthese des Gag-Polypolypeptids kann anhand der Luciferase-Aktivität von *renilla* detektiert werden, die weiterführende Translation durch den programmierten *Frameshift* würde zur Synthese des Gag-Pol-Polypeptids führen, das über die zweite co-translatierte Luciferase *firefly* detektiert wird. Die Biolumineszenz-Signale werden anschließend für die Effizienz-Bestimmung ins Verhältnis gesetzt. Plant und Dinman ermittelten mit einem dualen Luciferase-Assay eine HIV-1-*Frameshift*-Effizienz von 9,6 % in Jurkat-T-Zellen<sup>214</sup>, die auch in dieser Arbeit für die Herstellung der HIV-Proben verwendet wurden. Dieser Wert weicht jedoch von den hier ermittelten quantitativen Werten aus Tabelle 18 ab, wenn davon ausgegangen wird, dass 67,6 % Gag-spezifisches p6 und der restliche Anteil von 32,4 % Pol-spezifisches p6 durch die Leserahmenverschiebung entspricht. Dies liegt vor allem daran, dass der Reporter-Assay und das hier genutzte Massenspektrometrie-basierte Quantifizierungsverfahren auf grundsätzlich unterschiedlichen Messprinzipien beruhen und die Messgrößen verschieden sind. Der Vorteil des Luciferase-Assays ist die Schnelligkeit und eindeutige Detektion des alternativ produzierten Gag-Pol-Polypeptids durch die Expression der zweiten Luciferase. Ein grundsätzlicher Nachteil von Reporter-Systemen ist, dass nicht die natürlichen Bedingungen wiedergegeben werden, da z.B. nur eine kleine Teilsequenz analysiert wird, die zudem von künstlichen Sequenzen der Luciferasen umgeben wird. Das hier verwendete massenspektrometrische Verfahren nutzt stattdessen ausschließlich die p6- bezogen auf die CAp24-Quantifizierung. Die CAp24-Quantität beinhaltet dabei die Menge an Gag- und Gag-Pol-Polypeptiden, da es in beiden Vorläuferproteinen vorkommt. Das p6-Protein ist dagegen spezifisch für Gag. Da in den Peptide-Mapping-Experimenten und auch in gezielten Suchen nach Pol-spezifischen Peptiden keine Pol-Peptide eindeutig nachgewiesen werden konnten, ist der restliche Anteil von 32,4 % für ausschließlich Gag-Pol-Produkte zu hoch. Es wird vermutet, dass dieser Anteil von 32,4 % neben Gag-Pol-Produkten (5-10 % nach Luciferase-Assay) auch p6-fehlende Gag-Proteinvarianten ( $\Delta$ p6-Gag) enthält. Diesbezüglich wäre die Verteilung ~ 70 % GAGp55, 20-25 %  $\Delta$ p6-Gag und 10-5 % Gag-Pol-Polypeptide. Der Aspekt der möglichen Synthese von  $\Delta$ p6-Gag wurde bereits in Abschnitt 4.2.1 „Gag-Polypeptid“ (Seite 58) bezüglich des rekombinant hergestellten GAGp55-Proteins in *E. coli* diskutiert. Für das rekombinante GAGp55 beträgt der Anteil des vollständig synthetisierten GAGp55 in etwa 60 % (siehe Tabelle 7, Seite 60 und Abbildung 14, Seite 63). Der restliche Anteil mit insgesamt etwa 40 % entspricht  $\Delta$ p6-Gag. Wie bereits für diesen Fall diskutiert worden ist, wurden solche  $\Delta$ p6-Gag-Proteinvarianten in unterschiedlichen Expressionssystemen identifiziert<sup>172-177</sup>. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass solche  $\Delta$ p6-Gag-Proteinvarianten auch in humanen HIV-Wirtszellen, wie der hier verwendeten Jurkat-T-Zelllinie, exprimiert werden. Um dies tiefgründiger zu validieren, könnten in weiterführenden Arbeiten zusätzlich die viralen Enzyme aus Pol zielgerichtet quantifiziert werden. Werden solche

$\Delta$ p6-Gag-Proteine in der Jurkat-Zelllinie exprimiert, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass sie auch in HIV-infizierten Patienten produziert werden. Womöglich ist die Vielfalt der Expressionsprodukte vom *gag*- und *pol*-Genombereich größer. Das Gag-Polypeptid wird dabei bevorzugt synthetisiert. Der Wechsel von *gag*- in den *pol*-Leserahmen erfolgt an einer sogenannten *Slippery*-Sequenz U-UUU-UUA, an der sich eine spezifische Sekundärstruktur anschließt, die als *frameshift stimulatory signal* bezeichnet wird<sup>215</sup>. Dieses Sequenzmotiv und RNA-Sekundärstruktur könnte kritisch für das translatierende Ribosom sein und verursacht, dass das Ribosom den zu translatierenden RNA-Strang verliert und dadurch die Translation vorzeitig abbricht. Dadurch können  $\Delta$ p6-Gag-Proteinvarianten entstehen.

Der Anteil an Matrix-Protein ist um 20 % im Vergleich zu CAp24 reduziert, obwohl beide Proteine gleichermaßen in Gag- und Gag-Pol-Polypeptid existieren. In der Literatur wird von einer *N*-terminal verkürzten 40 kDa-GAG-Polypeptidform berichtet, die durch eine IRES (*internal ribosomal entry site*)-abhängige Translationsinitiation entsteht<sup>216,217</sup>. Die IRES-abhängige Expression beginnt am *N*-Terminus des CAp24-Proteins, wodurch MAP17 vollständig bei der verkürzten Expressionsvariante fehlt. Diese MAP17-trunkierte Gag-Proteinvariante ( $\Delta$ MAP17-Gag) wurde *in vitro*, in infizierten PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) und in Patientenisolaten nachgewiesen<sup>216,218,219</sup>. Daudé *et al.* konnten zeigen, dass aus Patientenproben isolierte HIV-Sequenzen die Expression von  $\Delta$ MAP17-Gag in Jurkat T-Zellen unterstützen<sup>219</sup>. Da auch in dieser Arbeit Jurkat T-Zellen für die HIV-Expansion verwendet wurden, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass in den hier analysierten Virusstocks neben dem vollständigen GAGp55 auch die  $\Delta$ MAP17-Gag-Proteinvariante exprimiert wurde. Die starke Sequenzkonservierung der AUG-Initiation der IRES für die Synthese von  $\Delta$ MAP17-Gag in allen von Daudé *et al.* analysierten Klonen lässt eine mögliche Schlüsselrolle dieser Form im viralen Replikationszyklus vermuten<sup>219</sup>.

Grundsätzlich können auch Varianzen in den Peptidsequenzen der HIV-Proben zu den reduzierten MAP17- und p6-Mengen im Vergleich zu CAp24 beitragen. Da die CAp24-Proteinquantifizierung anhand von drei Peptiden erfolgt und die bestimmte Präzision der CAp24-Quantifizierung hoch ist (siehe vorheriges Kapitel), ist der Einfluss der Sequenzvarianz in der CAp24-Quantifizierung gering. Da MAP17 und p6 jeweils mit einem Peptid quantifiziert werden, kann der Einfluss der Sequenzvariation nicht erfasst werden. Im Aminosäure-Sequenz-Alignment der GAG-Polypeptidregion (Abbildung 16, Seite 71) ist ersichtlich, dass die Stärke der Konservierung entsprechend CAp24>MAP17>p6 abnimmt.

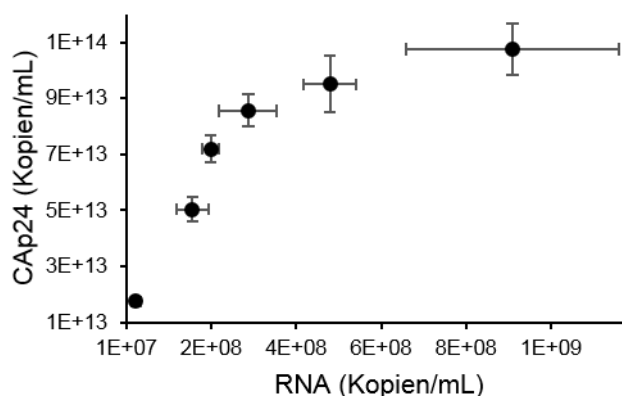
Eine bisher ungeklärte interessante Fragestellung ist, ob die verschiedenen Gag-Proteinvarianten wie  $\Delta$ p6-Gag und  $\Delta$ MAP17-Gag eine bestimmte biologische Funktion im Infektionsprozess ausüben oder ob es sich um eine Art der Regulierung der einzelnen Strukturproteinverhältnisse handelt. In diesem Zusammenhang bleibt auch zu klären, ob diese alternativen

Expressionsprodukte auch am Ende in Viruspartikel verpackt werden und die Stöchiometrie der einzelnen Strukturproteinelemente in Viruspartikeln entgegen der Erwartung von 1:1 in Wirklichkeit stärker variiert. Bei dieser Kalkulation der Proteinverhältnisse findet der Aspekt, dass theoretisch diese alternativen Translationsmechanismen auch kombiniert auftreten können, keine Berücksichtigung. Mit der Kombination der Translationsalternativen erhöht sich die Komplexität der möglichen Strukturproteinvarianten. Somit können neben GAGp55 und Gag-Pol, wie bereits erwähnt  $\Delta$ MAp17-Gag und  $\Delta$ p6-Gag entstehen, aber auch die „kombinierten“ Proteinvarianten  $\Delta$ MAp17 $\Delta$ p6-Gag oder  $\Delta$ MAp17-Gag-Pol.

Das NCp7-Protein, das für die Bindung der viralen RNA verantwortlich ist, konnte aufgrund der Herausforderung, geeignete Referenzmaterialien zu etablieren, nicht in diesen HIV-Materialien mittels IDMS quantifiziert werden. Theoretisch sollte es mit der Menge von CAp24 äquivalent sein, da trunkierte NCp7-Gag-Formen aus der Literatur nicht beschrieben sind. Baar *et al.* konnten anhand eines etablierten Immunoassays zeigen, dass die CAp24- und NCp7-Menge sehr gut miteinander korrelieren und schlussfolgern, dass beide Proteine aus einem Proteinvorläufer stammen, da sie stöchiometrisch äquivalent sind<sup>220</sup>. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die virale RNA-Produktion sehr gut mit NCp7 (und CAp24) korreliert<sup>220</sup>. Diesbezüglich wurde auch in diesen HIV-Proben die CAp24 zur RNA-Menge quantitativ verglichen und zusätzlich zum infektiösen Titer in Bezug gesetzt, was im nächsten Abschnitt näher erläutert wird.

#### 4.8. Verhältnis zwischen CAp24/RNA-Level und infektiösem Titer

Anhand der Daten zur Bestimmung der CAp24-Protein und RNA-Menge aus sechs unabhängig hergestellten HIV-Proben (siehe Tabelle 17, Seite 99), wurde das Verhältnis zwischen CAp24/RNA und infektiösem Titer ( $TCID_{50}$ ) analysiert. Die sechs Proben wurden zwar alle nach dem im Abschnitt 3.1.4 „Virusexpansion und Verarbeitung des HIV-Materials“ (Seite 28) beschriebenen Protokoll hergestellt, zeigen aber trotzdem Unterschiede in der Protein- und RNA-Quantität aufgrund von biologischen Variationen in der Zellkultur. Zum Beispiel wurden die Virussuspensionen abhängig vom Eintreten des Zellsterbens nach unterschiedlichen Inkubationstagen (7-14 Tage) geerntet. Für die Darstellung des Verhältnisses zwischen CAp24- und RNA-Menge in Abbildung 28 wurden die sechs gemessenen Proben nach ansteigender Protein- und RNA-Menge (Probe 1-6) geordnet, wie auch in Tabelle 17 (Seite 99) gezeigt. Daraus geht hervor, dass die CAp24-Proteinmenge mit der RNA-Menge bis zu einer Sättigung zunimmt und Protein- im Vergleich zur RNA-Bildung nachlässt. Dabei ist zu beachten, dass die Proteinmenge (Kopien/mL) im Vergleich zur RNA um ca. 5 Größenordnungen höher liegt, was insgesamt einen deutlichen Überschuss an Protein aufzeigt. Dabei kann auch die meist kürzere Lebensdauer von RNA im Vergleich zu Proteinen eine Rolle spielen<sup>221,222</sup>.



**Abbildung 28: Vergleich von HIV-CAp24- zur RNA-Menge.**

Dargestellt ist das Verhältnis der CAp24- zur RNA-Konzentration aus sechs HIV-Proben mit Standardabweichungen (A) und die entsprechende logarithmische Darstellung (B).

Dieser Überschuss an viralen Proteinen führt letztendlich auch zum Absterben der infizierten Zellen und damit zur Sättigung in der Expression. Da die CAp24-Proteinmenge pro Viruspartikel abhängig von der Partikelgröße ist und diese sehr variieren kann<sup>64</sup>, gilt CAp24 im Allgemeinen nicht als geeignetes Maß für die Kalkulation der Anzahl an Viruspartikeln. Zudem befindet sich ein Großteil der CAp24-Menge in der extrazellulären Matrix und wird dadurch in infizierten Individuen durch das Immunsystem erkannt und beeinflusst<sup>223,224</sup>. Dagegen kann

die virale RNA als definiertes HIV-Genom (2 RNA-Moleküle pro Partikel) direkt mit der Anzahl von Viruspartikeln in Bezug gesetzt werden<sup>225</sup>, da nicht in Viruspartikel verpackte RNA leicht durch RNasen abgebaut wird. Diesbezüglich wurde die Viruspartikelanzahl der sechs HIV-Proben anhand der RNA-Menge kalkuliert. Wie bereits erwähnt, hängt die CAp24-Menge pro Viruspartikel von der Größe der Viruspartikel ab, die aufgrund des Abschnürungsprozesses von den infizierten Zellen variieren kann (siehe Abbildung 4, Seite 10). Je größer die neu aufgebauten Viruspartikel an der Zellmembran der infizierten Zellen sind, desto mehr CAp24-enthaltenes GAGp55 wird beim Viruspartikel-Aufbau eingebaut (siehe Abbildung 3/A, Seite 8 und Abbildung 4, Seite 10). Mit der Annahme, dass in einem durchschnittlichen Viruspartikel 2400 CAp24-Moleküle existieren, wurde die theoretische CAp24-Menge der gemessenen Viruspartikelanzahl berechnet und mit der tatsächlich gemessenen CAp24-Menge verglichen, worüber der CAp24-Überschuss erfasst werden kann. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 gezeigt. Der durchschnittliche CAp24-Protein-Überschuss beträgt  $\sim 2,5 \times 10^2$  (250-facher CAp24-Überschuss).

**Tabelle 19: Kalkulation des CAp24-Proteinüberschusses**

Probe	Viruspartikel-Anzahl <sup>1</sup>	Theor. CAp24-Menge <sup>2</sup>	Gemessene CAp24-Menge			CAp24-Überschuss (gemessen/theor.)
	[Kopien/mL]	[Kopien/mL]	[Kopien/mL]	[pmol/mL]	[ng/mL]	
1	$1,65 \times 10^7$	$3,97 \times 10^{10}$	$1,75 \times 10^{13}$	29,0	725	$4,41 \times 10^2$
2	$8,29 \times 10^7$	$1,99 \times 10^{11}$	$5,03 \times 10^{13}$	83,6	2090	$2,53 \times 10^2$
3	$1,04 \times 10^8$	$2,50 \times 10^{11}$	$7,20 \times 10^{13}$	119,5	2987	$2,88 \times 10^2$
4	$1,48 \times 10^8$	$3,56 \times 10^{11}$	$8,55 \times 10^{13}$	142,0	3550	$2,40 \times 10^2$
5	$2,45 \times 10^8$	$5,87 \times 10^{11}$	$9,50 \times 10^{13}$	157,8	3945	$1,62 \times 10^2$
6	$4,59 \times 10^8$	$1,10 \times 10^{12}$	$1,08 \times 10^{14}$	178,6	4465	$9,82 \times 10^1$

<sup>1</sup> gemessene RNA-Menge in Kopien/mL dividiert durch 2, da 2 RNA-Moleküle pro Viruspartikel

<sup>2</sup> Viruspartikel-Anzahl multipliziert mit 2400 (Annahme: 2400 CAp24-Moleküle pro Viruspartikel)

In der Literatur wird angegeben, dass 100.000 HIV-1-Partikel äquivalent sind zu 10 pg CAp24<sup>61,226–228</sup>. Um die hier analysierten Proben mit den Angaben aus der Literatur zu vergleichen, wurde die Massenkonzentration von CAp24 mithilfe der Molekularmasse ( $\sim 25.000$  g/mol) berechnet und auf 100.000 Viruspartikel bezogen. Im Durchschnitt der hier analysierten sechs HIV-Proben entsprechen 100.000 HIV-1-Partikel 2,5 ng CAp24. Der ermittelte 250-fache Protein-Überschuss bekräftigt die Vermutung bezüglich der EM-Aufnahmen und Peptide-Mapping-Experimente des Virusmaterials (siehe Abschnitt 4.1, Seite 51), dass die quantifizierte virale CAp24-Proteinmenge wahrscheinlich nicht ausschließlich aus intakten Viruspartikeln stammt, sondern eher dem gesamten exprimierten Material der infizierten Zellen

entspricht. Die hier gemessenen durchschnittlichen CAp24-Konzentrationsbereiche betragen 120 pmol/mL bzw. 3000 ng/mL. Die IDMS für die Proteinquantifizierung in humanem Serum erreicht z.B. für das Wachstumshormon Quantifizierungsgrenzen von 25 fmol/mL bzw. 0,5 ng/mL<sup>229</sup>. Diesbezüglich existiert noch ein großer Spielrahmen bezüglich der niederen Konzentrationsbereiche für die entwickelte HIV-Proteinquantifizierungsmethode. Da die gemessene Proteinmenge nicht mit Viruspartikeln korreliert und auch der Protein-Überschussfaktor variiert, kann kein direkter Bezug zur RNA-Menge genommen werden. Anhand der Quantifizierung von unterschiedlichen HIV-Proteinen könnte ein komplexes Protein-Expressionsprofil erstellt werden, was wiederum Auskunft über die zelluläre Aktivität gibt. Proben von therapierten Patienten oder von Patienten mit einer niedrigen Viruslast können mithilfe der Massenspektrometrie nicht erfasst werden.

Zudem wurde das Verhältnis der Viruspartikelanzahl (2 RNA/Partikel) zum infektiösen Titer (TCID<sub>50</sub>) bestimmt. Dabei entspricht eine infektiöse Einheit (TCID<sub>50</sub>) theoretisch einem Viruspartikel<sup>228</sup>. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 gezeigt. Die TCID<sub>50</sub>-Werte liegen in einer Größenordnung, da der Virustiter der sechs Proben nicht stark variiert. Eine Ausnahme stellt Probe 2 dar, die einen deutlich höheren TCID<sub>50</sub> aufzeigt. Die berechneten Verhältnisse aus Viruspartikelanzahl zum infektiösen Titer der sechs Proben liegen in einem Bereich von  $\sim 10^1$ - $10^3$ . Ähnliche Verhältnis-Bereiche wurden mit  $1 \cdot 10^2$  von Bourinbaier<sup>230</sup> und mit  $10^2$ - $10^4$  von Klasse *et al.*<sup>231</sup> und Rusert *et al.*<sup>232</sup> bestimmt.

**Tabelle 20: Verhältnis Viruspartikel-Anzahl zum infektiösen Virustiter**

Probe	Viruspartikel-Anzahl <sup>1</sup> [Kopien/mL]	Infektiöser Titer <sup>2</sup> [TCID <sub>50</sub> /mL]	Verhältnis Viruspartikel-Anzahl zum infektiösen Titer
1	1,65 x 10 <sup>7</sup>	1,98 x 10 <sup>5</sup>	8,35 x 10 <sup>1</sup>
2	8,29 x 10 <sup>7</sup>	1,76 x 10 <sup>6</sup>	4,71 x 10 <sup>1</sup>
3	1,04 x 10 <sup>8</sup>	3,51 x 10 <sup>5</sup>	2,97 x 10 <sup>2</sup>
4	1,48 x 10 <sup>8</sup>	1,98 x 10 <sup>5</sup>	7,50 x 10 <sup>2</sup>
5	2,45 x 10 <sup>8</sup>	3,51 x 10 <sup>5</sup>	6,97 x 10 <sup>2</sup>
6	4,59 x 10 <sup>8</sup>	3,51 x 10 <sup>5</sup>	1,31 x 10 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> gemessene RNA-Menge in Kopien/mL dividiert durch 2, da 2 RNA-Moleküle pro Viruspartikel

<sup>2</sup> Werte beruhen auf Dreifach-Bestimmungen

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass der Anteil von infektiösen Viruspartikeln im Vergleich zur Gesamtpartikelzahl sehr gering ausfällt<sup>227,230,232–234</sup>, wobei insgesamt die analysierten Verhältnisse für HIV-1 stärker schwanken können<sup>235</sup>. Die Variation zwischen den Daten aus der Literatur kann darauf beruhen, dass teilweise unterschiedliche HIV-Probenmaterialien, Zellsysteme und unterschiedliche Probenvorbereitungen genutzt wurden. Im Durchschnitt wurde



für die hier analysierten Proben eine infektiöse Einheit pro 530 Viruspartikel (Viruspartikelanzahl/TCID<sub>50</sub>: 47-1310) gefunden. Rusert *et al.* fanden eine durchschnittliche infektiöse Einheit pro 5775 Viruspartikel (Viruspartikelanzahl/TCID<sub>50</sub>: 238-58901)<sup>232</sup>. Ein Grund für diese Varianz könnte z.B. der unterschiedliche Ursprung des HIV-Materials sein. Die hier analysierten Proben wurden durch HIV-Expansion des Stamms HIV-1<sub>BRU</sub> in Zellkultur hergestellt, weshalb hier der Anteil nicht-infektiöser Partikel eher auf die Produktion oder den Zusammenbau defekter Partikel zurückzuführen ist. Bei den von Rusert *et al.* analysierten Proben handelt es sich um HIV-Isolate aus Patientenproben, die auf PBMC-Zellen kultiviert wurden<sup>232</sup>, weshalb hier zusätzlich die immunologische Aktivität (Antikörper- und Komplement-System) aus dem Patienten den Anteil infektiöser Partikel reduzieren kann<sup>236,237</sup>.

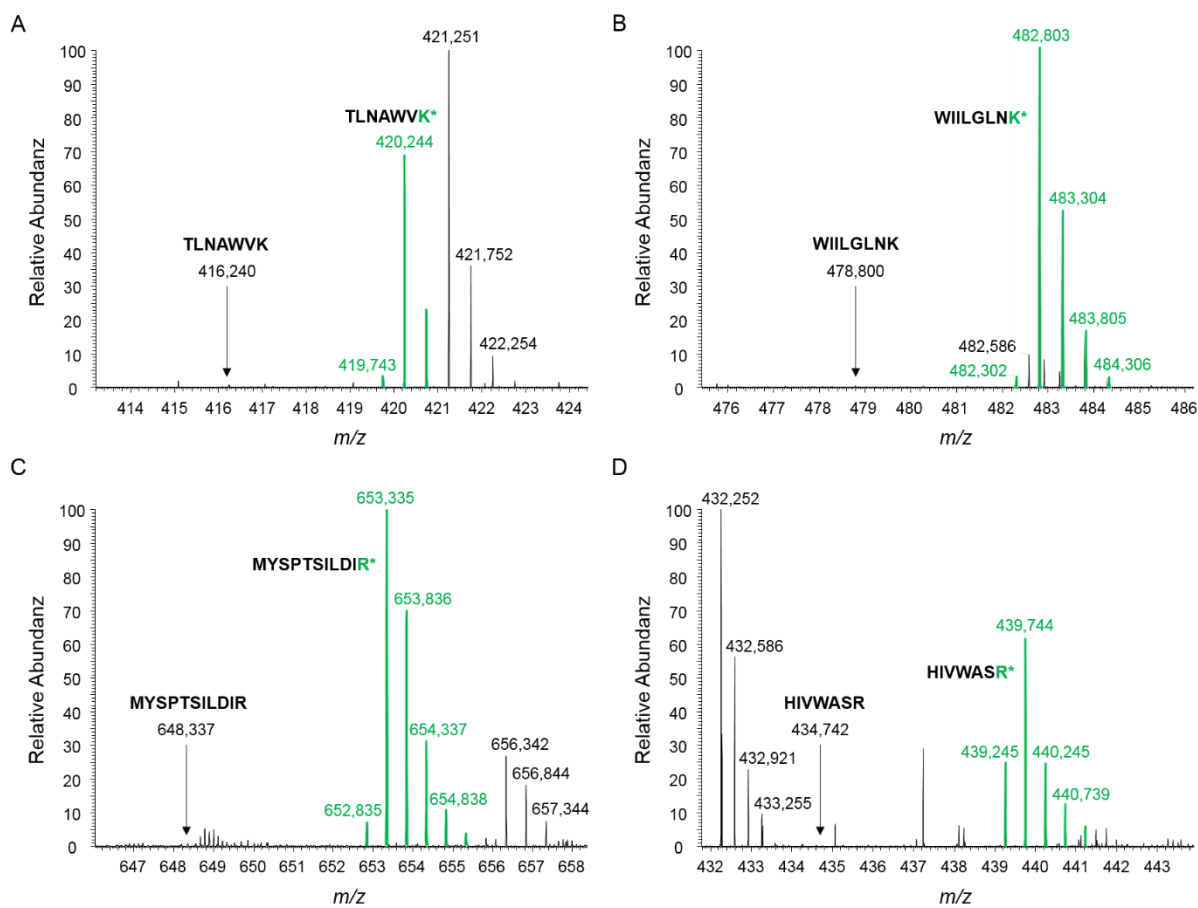
Mit ansteigender Protein- und RNA-Menge, sinkt auch der infektiöse Titer (siehe Tabelle 20). Der Abfall deutet auf eine zunehmende Instabilität der Viruspartikel in Suspension hin und könnte in den hier hergestellten Virusproben einen ausschlaggebenden Einfluss haben. Die Halbwertszeit der Infektiosität von HIV-1 *in vitro* wurde auf 36 h bei 37 °C geschätzt<sup>235</sup>. Die Halbwertszeit für die Reverse Transkriptase Aktivität sowie Core-Proteinen beträgt etwa 100 h und für das Glykoprotein Gp120 nur 30 h<sup>227</sup>. Das bedeutet, je länger die Viren in Zellkultur expandiert werden, desto instabiler wird das Env-Protein, was verantwortlich ist, um eine Infektion auszuüben.

Ein weiterer Punkt, weshalb der infektiöse Titer im Allgemeinen sehr gering gemessen wird, könnte sein, dass der Anteil an infektiösen Viruspartikeln in Wirklichkeit höher liegt, aber ein Großteil keine messbare Infektion auslöst. Dies kann an der sehr langsamen Diffusion von Virionen in Suspensionen liegen, weshalb sie die Zielzellen innerhalb der Inkubationszeit nicht erreichen. Selbst bei dem ersten Kontakt mit einer Zelle, können nachfolgende Schritte bis zur Integration zum Provirus fehlschlagen<sup>235</sup>.

Auch virale Faktoren bezüglich des Aufbaus von HIV-Partikeln und des Replikationszyklus spielen eine wichtige Rolle für die Infektiosität. Zum Beispiel sind die regulatorischen Proteine Tat und Rev essentiell für die Replikation von HIV und die akzessorischen Proteine unterstützen die Infektiosität<sup>238</sup>. Auch das dominierende HIV-Protein GAGp55 hat einen Einfluss auf die Infektiosität. Neu produzierte HIV-1 Virionen mit dem charakteristischen Gag-Polypeptid-Netz gelten als nicht infektiös. Erst durch die enzymatische Prozessierung der Gag-Moleküle in die einzelnen Struktureinheiten durch die virale Protease werden die Virionen reif und infektiös. Die Fraktion unreifer Viren in den hier analysierten Proben liegt, wie bereits diskutiert, unter der Nachweisgrenze, da GAGp55 weder über Western-Blot (Tabelle 11, Seite 78) noch über ein Gag-spezifisches Peptid mittels IDMS (Abschnitt 4.3.5 „Peptide mit Protease-Schnittstelle“, Seite 76) nachzuweisen war.

#### 4.9. Absolutes SILAC für isoto­penmarkiertes HIV-Referenzmaterial

Die metabolische Isotopenmarkierung mittels SILAC wird klassischerweise für die relative Proteom-Quantifizierung angewendet<sup>121</sup>. Dafür wird ein Ansatz einer Zellkultur in natürlichem Zellkulturmedium und ein weiterer Ansatz in isoto­penmarkiertem Medium ( $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -Arginin und  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -Lysin) kultiviert. Um z.B. die Auswirkungen eines Wirkstoffs auf das Protein-Profil der Zellen zu untersuchen, dient die natürliche Zellkultur als unbehandelte Kontrolle und die markierte Kultur wird mit dem Wirkstoff behandelt. Durch die Kombination beider Ansätze können anhand der leichten und schweren Peptide relative Veränderungen des Proteoms verursacht durch den Wirkstoff mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Im Gegensatz dazu kann SILAC aber auch für die Herstellung isoto­penmarkierter Quantifizierungsstandards genutzt werden<sup>239</sup>. Bezogen auf HIV ist die Idee, ein vollständig isoto­penmarkiertes HIV-Material mittels SILAC herzustellen, um es als potenziellen Standard einsetzen zu können. Das Herstellungsprotokoll ist unter Abschnitt 3.1.5 (Seite 29) beschrieben. Das danach produzierte Material wurde zunächst qualitativ bezüglich der Vollständigkeit der Isotopenmarkierung analysiert. Die Ergebnisse sind anhand von vier Peptid-Beispielen in Abbildung 29 (A-D) dargestellt. Daran ist zu erkennen, dass die Isotopenmarkierung des HIV-Materials mittels SILAC sehr effizient abläuft, da ausschließlich die  $m/z$ -Muster der isoto­penmarkierten Peptide (grün) nachweisbar sind. Die theoretische Lokalisation der  $m/z$ -Muster der natürlichen Peptide ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Da das isoto­penmarkierte HIV-Probenmaterial genauso hergestellt wurde wie das natürliche, sind beide Materialien chemisch nahezu identisch und weisen bezüglich der Viruspartikelstrukturen und Matrixkomponenten nahezu die gleichen Eigenschaften auf. Der Vorteil eines vollständig mittels SILAC isoto­penmarkierten Virusmaterials ist, dass alle HIV-Proteine markiert vorliegen. Nach einer detaillierten Charakterisierung des isoto­penmarkierten Materials und der absoluten Quantifizierung von HIV-Proteinen und RNA kann es als absoluter Quantifizierungsstandard eingesetzt werden. Diese absolute Quantifizierung des isoto­penmarkierten Materials kann mit dem Stand dieser Arbeit für das CAp24- und MAp17-Protein mithilfe der etablierten IDMS-Methode und die RNA-Quantifizierung mittels ddPCR erfolgen. Die Quantifizierung von p6 mithilfe des C-terminalen Peptids ist für dieses hergestellte markierte Material nicht möglich, da keine markierten Lysin- oder Arginin-Reste im Peptid enthalten sind. Diesbezüglich müsste die metabolische Isotopen-Markierung um weitere Aminosäuren wie z.B. Phenylalanin erweitert werden.



**Abbildung 29: Qualitative Analyse des isotonenmarkierten HIV-Materials.**

HIV-Material wurde mit  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -Arginin und  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -Lysin mittels SILAC isotonenmarkiert. Dargestellt sind die  $m/z$ -Muster der leichten und schweren Cap24-Peptide TLNAWVK (A), WIILGLNK (B), MYSPTSILDIR (C) und die des MAP17-Peptides HIVWASR (D). Grün dargestellte  $m/z$ -Spuren stellen die isotonenmarkierten Peptide dar. Die theoretische Lokalisation der  $m/z$ -Spuren der natürlichen Peptide sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Mit der Weiterentwicklung der IDMS-Methode bezüglich der Quantifizierung weiterer HIV-Proteine wie z.B. der viralen Enzyme und Glykoproteine, kann die Charakterisierung eines solchen Materials noch umfassender erfolgen und die potenziellen Anwendungen als absoluten Standard erweitern. Damit kann die Zusammensetzung von Viren und deren Unterschiede quantitativ genau erfasst werden, was z.B. für die quantitative Charakterisierung von Impfstoffmaterialien und für die Validierung deren Qualität relevant sein könnte.

Theoretisch sollte die Quantifizierung von HIV mit einem vollständig isotonenmarkierten HIV-Proben-Analogen noch genauer erfolgen als mit dem Einsatz einzelner Protein- und Peptid-Standards, da das markierte Virus-Material strukturell und chemisch der natürlichen Probe kongruent ist und es direkt zum natürlichen zu quantifizierenden HIV-Material hinzugesetzt werden kann. Demnach beginnt die interne Standardisierung direkt zu Beginn der Probenvorbereitung auf gleichem Level: natürliche zu markierte Viruspartikel bzw. natürliches zu markiertes HIV-Protein. Die Eignung eines solchen absoluten viralen Referenzmaterials sollte

in weiterführenden Arbeiten bezüglich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit von quantitativen Messungen untersucht werden. Ein quantitativer Vergleich unter Verwendung verschiedener Arten von Standards wie z.B. Lysin-markiertes CAp24-Peptid TLNAWVK\*, rekombinantes <sup>15</sup>N-markiertes CAp24-Protein und mittels SILAC Lysin/Arginin-markiertes-CAp24 aus Virusmaterial wäre dazu interessant.

Wie bereits erwähnt, ist der Vorteil der metabolischen Isotopenmarkierung, dass alle HIV-Proteine in einem Ansatz markiert werden und deshalb die Herstellung mittels SILAC preislich moderat ist im Vergleich dazu, wenn alle HIV-Proteine einzeln rekombinant und markiert hergestellt werden würden. Ein allgemein kritischer Aspekt für die Verwendung von Proteinen als Quantifizierungsstandard ist vor allem deren chemischen Stabilität, Homogenität in Lösung und Löslichkeit. Wie zum Beispiel für das HIV GAGp55-Protein im Abschnitt 4.2.1 (Seite 58) diskutiert worden ist, sind Proteine, die verschiedene Proteinvarianten ausbilden können oder zur Protein-Aggregation neigen, für die Verwendung als Referenzmaterial eher ungeeignet. Ein stabiles, homogenes und lösliches Protein ist für eine präzise und richtige Quantifizierung essentiell. Inwieweit dies für ein komplex aufgebautes isotopenmarkiertes Virusmaterial zutrifft, muss in weiterführenden Arbeiten näher untersucht werden. Zudem ist relevant, inwieweit der Einfluss auf das Messergebnis ist, wenn ein solches Material für die Quantifizierung abweichender HIV-Probenmaterialien z.B. variierende Proben-Beschaffenheit eingesetzt wird.

Der Einsatz eines markierten Proteinstandards für die Protein-Quantifizierung, der die erforderlichen Kriterien bezüglich der Stabilität und Löslichkeit erfüllt, erhöht meist die Genauigkeit der Messergebnisse, da Fehlerquellen, wie sie für Peptidstandards zutreffen, reduziert werden<sup>129,240</sup>. Das kompaktere Protein ist gegenüber chemischer Nebenreaktionen stabiler als kürzere einzelne Peptide, die eher zu Nebenreaktionen neigen wie z.B. zur Zyklisierung von *N*-terminalem carbamidomethylierten Cystein oder *N*-terminal gelegener Glutaminsäure (diskutiert in Abschnitt 4.3.3, Seite 73 und Abschnitt 4.3.5, Seite 76). Der Vorteil des markierten Proteins ist, dass es chemisch genauso aufgebaut ist wie das natürliche Protein aus der Probe. Deshalb werden sie beide gleichermaßen von Temperatur, pH und Proteolyse beeinflusst. Die proteolytischen Peptidbruchstücke entstehen parallel aus beiden Proteinen. Deshalb wird hier der Fehler bei einer unvollständigen Proteolyse eines Proteins kompensiert. Bei der Verwendung von Peptid-Standards ist es dagegen essentiell, dass die Proteolyse vollständig abläuft, da die Proteinkonzentration ansonsten unterbestimmt werden würde. Optimal wäre es, wenn der Peptidstandard direkt zu Beginn der Probenvorbereitung der Probe hinzugefügt wird und die anschließende Proteolyse so schnell wie möglich abläuft. Je schneller das natürliche Peptid vollständig aus dem Protein gebildet wird, desto eher sind Probe und Standard

chemisch auf Peptidebene gleich und alle weiteren Fehlerquellen während der Probenvorbereitung werden kompensiert. Würde stattdessen die Proteolyse langsam verlaufen, könnte dies zu einer Überbestimmung der Proteinkonzentration führen, da sich das markierte Peptid durch chemische Nebenreaktionen mit der Zeit verändert und damit die Peptid-Konzentration reduziert wird (diskutiert in Abschnitt 4.4.2, Abbildung 23, Seite 86). Andersherum würde es sich verhalten, wenn der Peptidstandard erst nach der Proteolyse zur Probe zugesetzt wird. In diesem Fall besteht das Risiko einer Unterbestimmung der Proteinkonzentration, da das natürliche Peptid, das während der Proteolyse entsteht, sich durch Nebenreaktionen verändern kann.



## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In der Virusdiagnostik wie auch für forschungsrelevante Fragestellungen in der Virologie ist der Einsatz von genau charakterisierten viralen Referenzmaterialien von Bedeutung. Je detaillierter die Charakterisierung erfolgt, desto verlässlicher ist die Verwendung des Materials zur quantitativen Bestimmung von Viren, deren Zusammensetzungen und Funktionalität. Für den Aufbau von Viren relevante Biomoleküle sind die Nukleinsäuren, die das virale Genom bilden, und die viralen Proteine, die für den strukturellen und funktionalen Aufbau der Viruspartikel essentiell sind. Die derzeit metrologisch genauesten Methoden im Bereich der Nukleinsäure-Quantifizierung ist die digitale PCR (z. B. droplet digital PCR: ddPCR) und in der Protein-Quantifizierung die Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie (IDMS). Beide Verfahren wurden in dieser Arbeit für die HIV-Quantifizierung auf ein *in vitro* hergestelltes Virusmaterial angewendet.

Mithilfe von ersten Peptide-Mapping-Analysen des hergestellten HIV-Materials konnte 57,4 % der Gag-Polyprotein (GAGp55)-Sequenz eindeutig nachgewiesen werden. GAGp55 ist ein Vorläufer-Protein, das von den infizierten Zellen produziert und in neue Viruspartikel eingebaut wird. Während der viralen Reifung wird es durch die virale Protease in die einzelnen Strukturprotein-Einheiten prozessiert: Matrix (MAp17), Capsid (CAp24), Spacer 1 (SP1), Nukleocapsid (NCp7), Spacer 2 (Sp2) und p6. Erst dann kann sich die native, reife Partikelstruktur ausbilden. Auf der Grundlage der Peptide-Mapping-Experimente von GAGp55 wurden für die Quantifizierung potenziell geeignete Peptide ausgewählt und verschiedene HIV-Protein- und Peptidstandards getestet. Da GAGp55 alle potenziellen Peptide für die Quantifizierung enthält, galt es zunächst als vielversprechender Kandidat für ein Referenzmaterial. Da aber während der rekombinanten Synthese weitere Proteinvarianten gebildet wurden und es als hydrophobes Protein zur Protein-Aggregation neigt, wurde es als Referenzmaterial dann doch nicht in Betracht gezogen. Stattdessen stellte sich heraus, dass das rekombinant hergestellte CAp24-Protein eine hohe Reinheit und Löslichkeit aufzeigte, weshalb es für die CAp24-Quantifizierung als Standard eingesetzt wurde. Wiederum wurde das 6 kDa kleine basische NCp7-Protein für die Quantifizierung ausgeschlossen, da der sehr hohe Arginin- und Lysin-Gehalt von 27,3 % eine vollständige Proteolyse behindert. Deshalb wurden für die Proteine stellvertretend spezifische Peptide als Standards getestet. Dabei ist vor allem die chemische Stabilität der Peptide bedeutend, da Peptide eher chemische Nebenreaktionen eingehen können als globuläre Proteine. So neigen z.B. *N*-terminal gelegene carbamidomethylierte Cystein- oder Glutamin-Reste zu Zyklisierungsreaktionen, wie es auch für das NCp7-Peptid „CFNCGK“ und für das GAGp55-spezifische Peptide mit enthaltener Protease-Schnittstelle (Λ)

„QAN<sup>6</sup>FLGK“ gezeigt werden konnte. Unreife Viren konnten anhand des GAGp55-spezifischen Peptids und in Western-Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden. Letztendlich wurde für die Quantifizierung von MAP17 das Peptid „HIVWASR“, für p6 das C-terminale Peptid „SLFGNDPSSQ“ eingesetzt und für CAP24 standen ein markiertes Peptid „TLNAWVK“ und ein <sup>15</sup>N-markierter Proteinstandard zur Verfügung. Für die CAP24-Quantifizierung mithilfe des markierten Proteinstandards wurden drei spezifische Peptide (TLNAWVK, MYSPTSILDIR und WIIILGLNK) in Betracht gezogen. Die natürlichen Proteine und Peptide dienen als Referenzmaterialien, weshalb von ihnen eine quantitative Aminosäure-Analytik in Form der doppelten Isotopenverdünnung durchgeführt wurde, um die genaue Stoffmengenkonzentration zu erhalten. Daran wurden die Konzentrationen der markierten Standards kalibriert.

Da neben dem CAP24-Proteinstandard auch Peptid-Standards für die Quantifizierung eingesetzt wurden, ist es für die Genauigkeit der Quantifizierung essentiell, die Vollständigkeit der Proteolyse zu validieren. Dazu wurden an HIV-Realproben Proteolyse-Zeitreihen untersucht. Die Vollständigkeit der Proteolyse unter den gewählten Reaktionsbedingungen konnte anhand des CAP24-Proteins gezeigt werden, da das Verhältnis des natürlichen Peptids „TLNAWVK“ aus der HIV-Probe zum <sup>15</sup>N-markierten Peptid aus dem Proteinstandard und zum Lysin-markierten Peptidstandard nahezu identisch war. Unabhängig von der Art des Standards, ob Protein oder Peptid, führt eine schnelle Proteolyse zu genaueren Ergebnissen, da so Probe und Standard schneller chemisch kongruent sind und alle Einflüsse der Probenvorbereitung gleichermaßen Probe und Standard betreffen. Im Fall von Proteinen können strukturelle Unterschiede zwischen natürlichen und markierten Proteinen zu leicht unterschiedlichen Proteolyse-Kinetiken führen. Doch vor allem beim Einsatz von Peptidstandards zu Beginn der Probenvorbereitung ist eine schnelle Proteolyse essentiell, da während der Inkubationszeit die Menge an internem Standard durch chemische Nebenreaktionen reduziert werden kann, woraus am Ende eine Überbestimmung der Proteinkonzentration resultieren kann. Das Ausmaß dieser Fehlerquelle kann durch eine schnelle Proteolyse reduziert werden. Dagegen kann der Fehler größer ausfallen, wenn der Standard erst nach der Proteolyse zur Probe zugesetzt werden würde, da das natürliche Peptid, das während der Proteolyse aus dem Protein gebildet wird, für eine längere Zeit den Reaktionsbedingungen ausgesetzt ist und während des gesamten Proteolyse-Ablaufs Nebenreaktionen eingehen kann. Durch die längere Inkubationszeit während der Proteolyse nimmt die Konzentration des natürlichen Peptids stärker ab, was dann wiederum eine Unterbestimmung der Protein-konzentration zur Folge hat. Vor diesem Hintergrund wurde mithilfe der metabolischen Isotopenmarkierung SILAC ein vollständig Lysin- und Arginin-isotopenmarkiertes Virusmaterial hergestellt. Die qualitative Analyse zeigte, dass die Markierung sehr effizient abläuft, da die entsprechenden natürlichen Peptide im Massenspektrum nicht nachgewiesen werden konnten. Mithilfe der hier etablierten



IDMS-Methode kann dieses markierte Virusmaterial bezüglich MAP17 und CAP24 absolut quantifiziert werden und die virale RNA mittels ddPCR. Nach einer ausgiebigen Charakterisierung und Quantifizierung des isotope markierten Virusmaterials kann es als absoluter Standard eingesetzt werden. Der Standard ist in diesem Fall chemisch genauso aufgebaut wie das natürliche Virusmaterial. Der Vorteil ist, dass durch die metabolische Markierung alle viralen Proteine markiert vorliegen. Mit der Weiterentwicklung der IDMS-Methode bezüglich der Quantifizierung weiterer HIV-Proteine wie z.B. der viralen Enzyme und Glykoproteine, kann dieses Virusmaterial noch umfassender charakterisiert werden und eröffnet weitere Anwendungsgebiete z.B. in der vollständigen quantitativen Charakterisierung von viralen Impfstoffen. Die Eignung des Materials als quantitativer Standard sollte in weiterführenden Arbeiten vergleichend zu Peptid- und Protein-Standards untersucht werden.

Nach Validierung der Vollständigkeit und Kinetik der Proteolyse konnte eine genaue Quantifizierung der einzelnen Strukturproteine MAP17, CAP24 und p6, die alle aus dem Vorläuferprotein GAGp55 stammen, erfolgen. Das gefundene Mengenverhältnis dieser Proteine im HIV-Material weicht vom erwarteten äquimolaren Verhältnis ab. Dies könnte auf alternativen Translationsmechanismen des *gag*-Genombereichs beruhen. Die MAP17-Menge ist im Vergleich zu CAP24 um ~20 % reduziert, was an einer IRES (*internal ribosomal entry site*)-abhängigen Translationsinitiation liegen kann, wodurch MAP17-trunkierte Gag-Proteinvarianten ( $\Delta$ MAP17-Gag) entstehen. Die Ursache für im Vergleich zu CAP24 um ~30 % reduziertes p6 ist wahrscheinlich ein RNA-Sequenzmotiv, das bekannterweise die ribosomale Leserasterverschiebung für die Gag-Pol-Synthese verursacht und andererseits zur vorzeitigen Beendigung der Translation führen kann, wodurch neben Gag-Pol auch p6-trunkierte Gag-Proteinvarianten ( $\Delta$ p6-Gag) gebildet werden können. Biologische Funktionen der  $\Delta$ MAP17- und  $\Delta$ p6- Gag-Proteinvarianten oder theoretisch mögliche kombinierte Proteinvarianten wie  $\Delta$ MAP17 $\Delta$ p6-Gag und  $\Delta$ MAP17-Gag-Pol sind nicht bekannt. Eventuell handelt es sich um eine Regulierung der Stöchiometrie der einzelnen Strukturproteinkomponenten. Diesbezüglich stellt sich die Frage, inwieweit diese alternativen Expressionsprodukte in intakte und funktionale Viruspartikel eingebaut werden oder ob es sich um reine zelluläre Expressionsprodukte handelt. Theoretisch kann der Einbau von  $\Delta$ MAP17-Gag in neue Viruspartikel über hydrophobe Interaktionen mit benachbarten Gag-Molekülen über CAP24-Wechselwirkungen erfolgen.  $\Delta$ p6-Gag kann genauso wie GAGp55 über die N-terminalen myristoylierten Matrix-Proteine in die Membran der neu-aufgebauten Viruspartikel verpackt werden. Um dies zu klären, kann in weiterführenden Arbeiten diese Verhältnisbestimmung mit reinen Viruspartikel-Suspensionen überprüft werden und zusätzlich weiterführend die viralen Enzyme, die aus Gag-Pol stammen, analysiert werden.

Zudem wurde die Protein- zur RNA-Menge im HIV-Material miteinander verglichen. Dazu wurde neben der IDMS auch eine ddPCR-Methode zur RNA-Quantifizierung etabliert und optimiert. Für den quantitativen Vergleich wurden sechs HIV-Proben *in vitro* unabhängig voneinander hergestellt und die CAp24-Proteinmenge mittels IDMS und die RNA-Menge mittels ddPCR quantifiziert. Die ddPCR als technologische Weiterentwicklung zeichnet sich durch ihre hohe technische Präzision aus und ist ein sehr robustes System, was auch für die hier analysierten HIV-Proben mit einer technischen Präzision von  $\pm 0,7\%$  gezeigt werden konnte. Die technische Präzision der IDMS ist mit  $2,5\%$  geringer. Dagegen konnte mit der IDMS aufgrund der internen Standardisierung eine bessere Reproduzierbarkeit der Komplettanalysen mit  $\pm 2\%$  im Vergleich zur ddPCR mit  $\pm 3,8\%$  erzielt werden. Die Variabilität während der Probenvorbereitung kann zwar mit der ddPCR nicht kompensiert werden, dennoch ist es für eine molekularbiologische Methode eine beachtliche Leistung, eine derartige Präzision und Reproduzierbarkeit ohne Verwendung eines Standards zu erreichen. Hier zeigt sich das Potential der ddPCR zum neuen Goldstandard in der Nukleinsäure-Quantifizierung<sup>12,23</sup>. Kombiniert mit der Protein-Quantifizierung mittels IDMS als anerkannte Primärmethode können virale Referenzmaterialien sehr genau charakterisiert werden.

Anhand der gemessenen sechs HIV-Proben konnte gezeigt werden, dass mit Zunahme der RNA-Menge auch die Proteinmenge zunimmt, wobei bei höheren Konzentrationen eine Sättigung bezüglich der CAp24-Proteinmenge auftritt. Ein Grund könnte der deutliche Protein-Überschuss sein, wodurch die Proteinexpression durch das Absterben der Zellen zum Erliegen kommt. Bezogen auf die Viruspartikelanzahl, die anhand der gemessenen RNA abgeschätzt werden kann, und der angenommenen 2400 CAp24-Moleküle in einem durchschnittlichen Viruspartikel, wurde ein Protein-Überschuss von durchschnittlich  $2,5 \times 10^2$  (Bereich:  $0,98 \times 10^2$ - $4,41 \times 10^2$ ) ermittelt. Demnach kann das quantifizierte CAp24 nicht ausschließlich aus intakten Viruspartikeln stammen, sondern liegt auch durch das Absterben der Zellen in der extrazellulären Matrix vor. Das Verhältnis der Viruspartikelanzahl zum infektiösen Titer (TCID<sub>50</sub>) liegt in einem Bereich von  $\sim 10^1$ - $10^3$  und entspricht ähnlichen Angaben aus der Literatur. Der meist sehr niedrig gemessene infektiöse Virustiter im Vergleich zur Viruspartikelanzahl kann vom tatsächlichen Wert aufgrund von unterschiedlichen biologischen Faktoren abweichen.

In der klinischen Praxis wird für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs und für das therapeutische Monitoring einer HIV-Infektion die virale RNA mittels qPCR-Standardverfahren quantifiziert. Ziel einer Therapie ist es, die Viruslast bis unter die PCR-Nachweisgrenze zu drücken. Diesbezüglich erreicht die Massenspektrometrie im Prinzip nicht die nötige Sensitivität für therapierte Patienten, weshalb die Methode eher in der Charakterisierung von Referenzmaterialien Anwendung findet.

## 6. Anhang

### 6.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
aa	amino acid
Acc.-Nr.	Accession-Nummer
ACN	Acetonitril
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
amu	atomic mass unit
AQUA	absolute quantification of proteins via peptide standards
as	antisense
bp	Basenpaare
c	Stoffmengenkonzentration
C <sub>T</sub>	cycle threshold
CAp24	Capsid-Protein
CCQM	Consultative Committee for Amount of Substance
CD4	cluster of differentiation 4
cDNA	complementary DNA
CID	collision-induced dissociation
CPE	cytopathic effect
CRF	circulation recombinant form
Da	Dalton
ddPCR	droplet digital PCR
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dPCR	digital PCR
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
EIC	extracted ion chromatogram
EM	Elektronenmikroskopie
env	envelope
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
ESI	electrospray ionization
FA	Ameisensäure (formic acid)
FDR	false discovery rate
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
FTMS	fourier transform mass spectrometry
gag	group-specific antigen
GAGp55	Gag-Polyprotein

Gag-Pol	Gag-Pol-Polypeptide
Gp160	Glyko-Vorläuferprotein
Gp120	Glyko-Oberflächenprotein
Gp41	transmembranes Glykoprotein
GUM	Guide to the expression of uncertainty in measurement
HCD	higher energy collisional dissociation
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HILIC	hydrophilic interaction chromatography
HIV	human immunodeficiency virus
His-Tag	Histidin-Tag
HPLC	high performance liquid chromatography
ICAT	isotope-coded affinity tag
IDMS	isotope dilution mass spectrometry
IAA	Iodacetamid
IRES	internal ribosomal entry site
iTRAQ	isotope tags for relative and absolute quantification
kb	Kilobasen
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LC	liquid chromatography
LIT	linear ion trap
LTR	long terminal repeat
MAp17	Matrix-Protein
MMLV	moloney murine leukemia virus
MRM	multiple reaction monitoring
mRNA	messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie/ Massenspektrometer
MS oder MS <sup>1</sup>	Precursor-Scan
MSMS oder MS <sup>2</sup>	Tandem-Massenspektrometrie bzw. Fragmentationenspektrum
MW	molecular weight
NCp7	Nukleocapsid-Protein
Nef	negative regulatory factor
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
p6	Linkprotein
p6*	pol-spezifisches p6
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pen	Penicillin
Pol	polymerase
ppm	parts per million
prb	probe (Sonde)
PSAQ	protein standards for absolute quantification
PSM	peptide-spectrum matches
PTB	Physikalisch-Technische-Bundesanstalt
PVDF	Polyvinylidendifluorid

---

PRM	parallel reaction monitoring
Pyro-C	(R)-5-oxohydro-1,4-thiazin-3-Carbonsäure
Pyro-E	Pyroglutamat
QconCAT	quantification concatemer
qPCR	quantitative PCR
QqQ	Triple-Quadropol
Rev	regulator of expression of virion proteins
RNA	ribonucleic acid
RP	reverse phase
rpm	round per minute
RRE	Rev responsive element
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription/ Reverse Transkriptase
RTC	reverse transcription complex
s	sense
SCX	strong cation exchange chromatography
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SI	système international d'unités (internationales Einheitensystem)
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SIM	selected ion monitoring
SIV <sub>cpz</sub>	simian immunodeficiency virus (Schimpanse)
Sp1	Spacer 1
Sp2	Spacer 2
SPE	solid phase extraction
StAb	Standardabweichung
Strep	Streptomycin
Tat	transactivator of transcription
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween20
TCID <sub>50</sub>	50 % tissue culture infectious dose
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TGS	Tris-Glycin-SDS-Puffer
Tm	Schmelztemperatur
TMT	tandem mass tag
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
U	Erweiterte Messunsicherheit
UV	ultraviolet
Vif	virion infectivity factor
Vpr	viral protein r
Vpu	viral protein u
WHO	world health organization

## 6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Ergebnisse eines Ringversuchs zur quantitativen Bestimmung von HIV-1	2
Abbildung 2:	Genomstruktur und Genprodukte von HIV-1.	8
Abbildung 3:	Morphologie unreifer (A) und reifer (B) HIV-1-Partikel.	8
Abbildung 4:	Replikationszyklus von HIV.	10
Abbildung 5:	Schematische Darstellung eines Taq Man-Assays und qPCR	15
Abbildung 6:	Arten der quantitativen Massenspektrometrie in der Proteinanalytik	17
Abbildung 7:	Prinzip der IDMS.	20
Abbildung 8:	Schematischer Aufbau des Orbitrap Elite Massenspektrometers.	23
Abbildung 9:	Ionenserien bei der Fragmentierung von Peptiden.	23
Abbildung 10:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des HIV-Probenmaterials.	51
Abbildung 11:	Western-Blot-Analyse von HIV-Proben.	54
Abbildung 12:	Sequenzabdeckung von GAGp55 in HIV-Proben.	55
Abbildung 13:	SDS-PAGE und Western-Blot von rekombinantem GAGp55-Protein	59
Abbildung 14:	Massenspektrometrische Charakterisierung von drei GAGp55-Formen	63
Abbildung 15:	ESI-LC-MS-Analyse des natürlichen und markierten CAP24-Proteins.	65
Abbildung 16:	Aminosäure-Sequenz-Alignment der GAG-Polyproteinregion.	71
Abbildung 17:	Zyklisierung von N-terminalem Cystein in Peptiden	75
Abbildung 18:	Zyklisierung von N-terminalem Glutamin zu Pyroglutamat, einem $\gamma$ -Lactam	77
Abbildung 19:	Massenspektren der natürlichen und markierten Peptide zur CAP24-Quantifizierung in HIV	81
Abbildung 20:	Massenspektren der natürlichen und markierten Peptide zur MAP17- und p6-Quantifizierung in HIV	82
Abbildung 21:	Zeitverlauf der HIV-CAP24-Proteolyse	84
Abbildung 22:	Zeitverlauf der HIV-p6-Proteolyse.	85
Abbildung 23:	Zeitverlauf der HIV-MAP17-Proteolyse	86
Abbildung 24:	Optimierung der cDNA-Synthesebedingungen	90
Abbildung 25:	Überprüfung der DNA-Produktgrößen mit gag- und pol-PCR-Assay	93
Abbildung 26:	Temperaturgradient zur Optimierung der Annealing-Temperatur für pol (A)- und gag (B)	95
Abbildung 27:	Übersicht zum experimentellen Vorgehen für den quantitativen Protein-RNA-Vergleich	96
Abbildung 28:	Vergleich von HIV-CAP24- zur RNA-Menge	104
Abbildung 29:	Qualitative Analyse des Isotopen-markierten HIV-Materials	109

### 6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Geräte Parameter der HPLC-Anlage VWR Hitachi Chromaster	40
Tabelle 2:	Grundeinstellungen des LTQ Orbitrap Elite Massenspektrometer	42
Tabelle 3:	Messparameter der LTQ Orbitrap Elite für Peptide-Mapping Experimente	44
Tabelle 4:	Programmeinstellungen „Proteome Discoverer“	45
Tabelle 5:	Proteinprofil der präparierten HIV-Proben	53
Tabelle 6:	Peptide-Mapping von GAGp55 in HIV-Probe	56
Tabelle 7:	Kalkuliertes Molekulargewicht von GAGp55-Proteinformen mittels Gelanalyse	60
Tabelle 8:	Peptide Mapping von rekombinantem GAGp55	61
Tabelle 9:	Peptide Mapping von rekombinantem CAp24	67
Tabelle 10:	Peptide Mapping von rekombinantem NCp7	69
Tabelle 11:	Stoffmengenkonzentration und erweiterte Messunsicherheit der HIV Peptid-Referenzmaterialien	78
Tabelle 12:	Vergleich verschiedener Quantifizierungs-Modi für drei CAp24-Peptide an der Orbitrap Elite	80
Tabelle 13:	Eigenschaften von Primern und Sonden	91
Tabelle 14:	CT-Werte der cDNA-Konzentrationsreihe für gag- und pol-Assay	93
Tabelle 15:	Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration am Beispiel des gag-Assays	94
Tabelle 16:	Messergebnisse der HIV-CAp24 und -RNA Quantifizierung und Wiederholpräzision	97
Tabelle 17:	Vergleich der HIV-CAp24 und -RNA-Quantität von sechs HIV-Proben	99
Tabelle 18:	Ergebnisse zur Proteinstöchiometrie von MAp17, CAp24 und p6	100
Tabelle 19:	Kalkulation des CAp24-Proteinüberschusses	105
Tabelle 20:	Verhältnis Viruspartikel-Anzahl zum infektiösen Virustiter	106
Tabelle 21:	Zelllinien und deren Eigenschaften	122
Tabelle 22:	Medien-Zusammensetzungen	123
Tabelle 23:	Aminosäuren	124
Tabelle 24:	chemisch-synthetisierte Peptide	125
Tabelle 25:	rekombinante Proteine	126
Tabelle 26:	primäre und sekundäre Antikörper	127
Tabelle 27:	Oligonukleotide	127
Tabelle 28:	HPLC-Analgen	134
Tabelle 29:	Massenspektrometer	134
Tabelle 30:	HPLC-Säulen	136
Tabelle 31:	Ergebnis der Validierung von HIV-Inaktivierungsprotokollen	138
Tabelle 32:	m/z-Werte für Precursor- und intensivsten Fragmentionen	140

## 6.4. Materialien

### 6.4.1. Zelllinien und Zellkulturmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 21 aufgelistet und wurden vom NIH AIDS Research & Reference Reagent Program bezogen.

**Tabelle 21: Zelllinien und deren Eigenschaften**

Zelllinie	Zelltyp	Eigenschaften	Referenzen
Jurkat (E6-1)	humane lymphoblastische T-Zelllinie, CD4 <sup>+</sup>	mögliche $\gamma$ -Interferon-Sekretion	241
TZM-bl	HeLa-Zelllinie, CD4 <sup>+</sup> CCR5 <sup>+</sup>	Luciferase- und $\beta$ -Galaktosidase-Gen unter HIV-1-Promotorkontrolle	242–244

Nachfolgend sind alle verwendeten Medienkomponenten und -zusätze aufgelistet und in Tabelle 22 sind die jeweiligen Medien-Zusammensetzungen aufgeführt.

#### Medien und Zusätze:

Fetal Bovine Serum (fetales Kälberserum, FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Darmstadt)
Fetal Bovine Serum, dialyzed, US origin	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Gibco™ DMEM (4,5 g/L Glukose + L-Glutamin)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Gibco™ L-Glutamine (100x; 200 mM)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Gibco™ Pen Strep (Penicillin 5000 U/mL, Streptomycin 5000 µg/mL)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Gibco™ RPMI 1640 (+ L-Glutamin)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
HyClone™ HEPES solution (1 M)	GE Healthcare Life Sciences (Utah, USA)
L-Arginin-HCl, <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> (50 mg)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
L-Lysin-2HCl, <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> (50 mg)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
RPMI 1640 Medium for SILAC	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)

#### Weitere Zellkultur spezifische Chemikalien:

Gibco™ PBS (pH 7,4; -MgCl <sub>2</sub> ; -NaCl)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Trypsin-EDTA-solution (1x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)



Tabelle 22: Medien-Zusammensetzungen

Medium	Zelllinie	Verwendung	Zusammensetzung
cRPMI	Jurkat	Kultur	RPMI 1640, 10 % FKS, 10 mM HEPES, 1 % Pen Strep
DMEM	TZM-bl	Kultur	DMEM, 10 % FKS, 1 % Pen Strep
DMEM-GM	TZM-bl	TCID <sub>50</sub> -Assay	DMEM, 10 % FKS, 25 mM HEPES, 1 % Glutamin
SILAC-RPMI	Jurkat	SILAC	500 mL RPMI 1640 Medium for SILAC, 50 mL FKS (dialyzed, US origin), 50 mg L-Lysine-2HCl ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ), 50 mg L-Arginine-HCl ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ), 10 mM HEPES, 1 % Pen Strep

#### 6.4.2. HIV-Stamm

Alle HIV-Arbeiten wurden mit dem Stamm HIV-1<sub>BRU</sub> (Subtyp B) vom National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, UK) durchgeführt. Die verwendeten 1 mL-Aliquote sind Virusüberstände (Tag der Abnahme: 17.07.2017) aus einer Virusexpansion in Jurkat-T-Zellen. Die Lagerung der Aliquote erfolgte bei -80 °C.

### 6.4.3. Aminosäuren

Tabelle 23: Aminosäuren

Aminosäuren	Molare Masse	Reinheit
SILAC-Anwendung <sup>1</sup>		
L-Arginin-HCl, $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ (50 mg)	-	>99 %
L-Lysin-2HCl, $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ (50 mg)	-	>99 %
zertifizierte Referenzmaterialien <sup>2</sup>		
L-Isoleucin (NMIJ CRM 6013-a)	131,17 g/mol	99,7 % $\pm$ 0,2 %
L-Leucin (NMIJ CRM 6012-a)	131,17 g/mol	99,9 % $\pm$ 0,2 %
L-Phenylalanin (NMIJ CRM 6014-a)	165,19 g/mol	99,9 % $\pm$ 0,2 %
L-Prolin (NMIJ CRM 6016-a)	115,13 g/mol	99,9 % $\pm$ 0,2 %
L-Valin (NMIJ CRM 6015-a)	117,15 g/mol	99,8 % $\pm$ 0,2 %
isotopenmarkierte Aminosäuren <sup>3</sup>		
L-Isoleucin- $^{13}\text{C}_6$ (CIL CLM-2248)	137,13 g/mol	98 %
L-Leucin- $^{13}\text{C}_6$ (CIL CLM-2262)	137,13 g/mol	98 %
L-Phenylalanin- $^{13}\text{C}_9^{15}\text{N}$ (CIL CNLM-575)	175,10 g/mol	98 %
L-Prolin- $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}$ (CIL CNLM-436)	121,09 g/mol	98 %
L-Valin- $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}$ (CIL CNLM-442)	123,10 g/mol	98 %

<sup>1</sup> Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)<sup>2</sup> National Metrology Institute of Japan (Tsukuba, Japan)<sup>3</sup> Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Massachusetts, USA)

#### 6.4.4. Peptide

**Tabelle 24: chemisch-synthetisierte Peptide**

Peptid-Sequenz	HIV-Protein	Molare Masse	Hersteller
CFNCGK	NCp7	670,81 g/mol	EUROGENTEC, Seraing, Belgien
CF*NCGK	NCp7	680,77 g/mol	EUROGENTEC, Seraing, Belgien
HIVWASR	MAp17	868,01 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
HIVWASR*	MAp17	877,93 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
QANFLGK	NCp7/Sp2	776,89 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
QANFLGK*	NCp7/Sp2	784,83 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
SLFGNDPSSQ	p6	1051,09 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
SLF*GNDPSSQ	p6	1061,01 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
SLYNTVATLYCVHQR	MAp17	1768,02 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
SLYNTVATLYCVHQR*	MAp17	1777,94 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
TLNAWVK	CAp24	830,97 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
TLNAWVK*	CAp24	838,91 g/mol	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin

\*isotopenmarkierte Aminosäure: Phenylalanin (F)- $^{13}\text{C}_9^{15}\text{N}$ , Arginin (R)- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ , Lysin (K)- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$

### 6.4.5. Proteine

Tabelle 25: rekombinante Proteine

Protein	Aminosäuresequenz	MW [Da]	Hersteller
NCp7	MQRGNFRNQRKIVKCFNCGKEGHTARN CRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQ AN	6426	GenScript Corp., New Jersey, USA
His-CAp24	MHHHHHHPIVQNIQGQMVHQAISPRTL NAWVKVVEEKAFSPEVPMFSALSEGATP QDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEE AAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSD IAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKR WILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFR DYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETL LVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTA CQGVGGPGHKARVL	26.533	EUROGENTEC, Seraing, Belgien
His-CAp24*	Aminosäuresequenz siehe His-CAp24, vollständig <sup>15</sup> N-markiert		Trenzyme GmbH, Konstanz
His-GAGp55	MGHHHHHHHHHENLYFQGGMGARASV LSGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIV WASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQ LQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRI EIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAAD TGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAISP RTLNAWVKVVEEKAFSPEVPMFSALSE GATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKET INEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREP RGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIPVG EIYKRWILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGP KEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNW MTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEE MMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVT NSATIMMQRGNFRNQRKIVKCFNCGKE GHTARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMK DCTERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQS RPEPTAPPEESFRSGVETTTTPQKQEPI DKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ	58.300	Trenzyme GmbH, Konstanz

### 6.4.6. Antikörper

**Tabelle 26: primäre und sekundäre Antikörper**

Antikörper	Antigen	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
Anti-HIV-p24 (orb23262), polyklonal	HIV-1 CAp24	Ziege	1:200	Biorbyt Ltd., Cambridge, Großbritannien
Rabbit-anti-goat-HRP	Ziege IgG (H+L)	Hase	1:2000	Southern Biotech, Birmingham, USA

### 6.4.7. Oligonukleotide

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma „Integrated DNA Technologies Inc. (Leuven, Belgien)“ synthetisiert.

**Tabelle 27: Oligonukleotide**

Primer-Name	Quelle	Sequenz (5' – 3')	Position (nt)*
HIV pol (mf299)-s	<sup>30</sup>	GCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTA	2536-2562
HIV pol (mf302)-as	<sup>30</sup>	CAAATTTCTACTAATGCTTTTATTTTTC	2634-2662
HIV pol (mf348)-prb	<sup>30</sup>	56-FAM/AAGCCAGGA/ZEN/ATGGATGGCC/3IABkFQ <sup>1</sup>	2586-2604
HIV gag-s	Neu	GAAGCTGCAGAATGGGATAGA	1411-1431
HIV gag-as	Neu	CCTATTTGTTCTGAAGGGTACT	1510-1532
HIV gag-prb	Neu	56-FAM/ATTGCACCA/ZEN/GGCCAGATGAGAGAA/3IABkFQ <sup>1</sup>	1456-1479
LTR-fulllength-as	<sup>206,207</sup>	AGCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC	9633-9607

\*Koordinaten entsprechen der Lokalisation in der Referenzsequenz HXB2 (Acc.Nr.: K03455)

<sup>1</sup> 56-FAM = Fluorescein, ZEN = interner dark Quencher, 3IABkFQ = Iowa Black Quencher ideal für Fluorescein

### 6.4.8. Chemikalien

Acetonitril für LC-MS, ChemSolute®	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen)
Acrylamid, BioScience-Grade (≥ 99,9 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ameisensäure (98-100 %)	Merck KGaA (Darmstadt)
Ammoniumacetat	Merck KGaA (Darmstadt)
Ammoniumhydrogencarbonat (≥ 99,5 %)	Fluka Chemie GmbH (Buchs)
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
ddPCR droplet generation oil for probes	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR droplet reader oil	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR supermix for probes (no dUTP)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

Dithiothreitol ( $\geq 99\%$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ethanol absolut	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Essigsäure ( $> 99,5\%$ )	Fluka Chemie GmbH (Buchs)
Essigsäure Rotipuran (100 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Flüssig-Stickstoff	Linde (Braunschweig)
Formaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Guanidinhydrochlorid ( $\geq 99\%$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Helium-Gas	Linde AG (München)
Iodacetamid SigmaUltra	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Iso-Propanol für LC-MS, ChemSolute®	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen)
Kaliumchlorid ( $> 99\%$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt)
Laemmli Sample Buffer (4x)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Methanol für LC-MS, ChemSolute®	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen)
Midori Green	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen)
Milchpulver	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt)
PBS (Tabletten)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Phenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Phosphorsäure (85 %)	Fluka Chemie GmbH (Buchs)
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
RT-PCR Grade Water (10 x 1,5 mL)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Salzsäure (6N), Sequencing Grade	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
TGS-Puffer 10x (Tris/Glycin/SDS)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Trans-Blot Turbo Transferpuffer (5x)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

---

Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trizma® base (≥ 99,9 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trizma® hydrochloride (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trypsin (bovine pancreas, TPCK behandelt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trypsin (proteomics grade, BioReagent)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trypsin-EDTA-solution (1x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Tween20 (EIA grade)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Uranylacetat	Science Services GmbH (München)
Z2 Coulter Counter Isoton	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)

#### 6.4.9. Kits

Britelite plus Reporter Gene Assay System	PerkinElmer Inc. (Waltham, USA)
Clarity Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
MMLV Reverse Transcriptase	
1 <sup>st</sup> -Strand cDNA Synthesis Kit	Epicentre (Madison, USA)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Rockford, USA)
PrimeTime Gene Expression Master Mix	IDT Inc. (Skokie, USA)
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen GmbH (Düsseldorf)
SimplyBlue SafeStain	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
(Transferpuffer, PVDF-Membran, Filter)	

#### **6.4.10. Puffer und Lösungen**

##### **Agarose-Gelelektrophorese:**

0,5 M EDTA pH 8	0,5 M EDTA-Na <sub>2</sub> pH 8 (mit 10 M NaOH justiert)
50x TAE	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure (100 %) 10 % 0,5 M EDTA-Na <sub>2</sub> , pH 8 pH 8 (mit NaOH justiert)
Laufpuffer	1x TAE
0,8 % oder 4 % Agarosegele	1x TAE 0,8 % oder 4 % Agarose 2 % Midori Green

##### **SDS-PAGE:**

1x TGS-Laufpuffer (Bio-Rad)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 SDS (w/v) pH 8,3
Protein-Probenpuffer	4x Laemmli-Puffer (Bio-Rad) 10 % 2-Mercaptoethanol

##### **Western-Blot:**

Trans-Blot Turbo Transferpuffer (Kit, Bio-Rad)	20 % Trans-Blot Turbo Transferpuffer (5x) 20 % Ethanol 60 % Aqua dest.
1x TBS	20 mM Tris 500 mM NaCl pH 7,5



---

1x TBS-T	1x TBS 0,1% Tween20
Blockinglösung	1x TBS-T 1% Casein oder 10 % Milchpulver
<b>Proteolyse in Gel:</b>	
10 mM DTT	10 mM Dithiothreitol 100 mM Ammoniumbicarbonat
55 mM IAA	55 mM Iodacetamid 100 mM Ammoniumbicarbonat
0,1 µg/µL Trypsin-Aliquote (proteomics grade)	20 µg Trypsin pro Ampulle 200 µL 1 mM HCl jeweils 10 µL Aliquote erstellen
Trypsin-Puffer	10 mM Ammoniumbicarbonat 10 % Acetonitril
12 ng/µL Trypsin-Reagenzlösung	10 µL Trypsin-Aliquot (0,1 µg/µL) 75 µL Trypsin-Puffer
Peptidextraktionsmittel	5 % Ameisensäure/ Acetonitril (1:2, v/v)
<b>Proteolyse in Lösung:</b>	
10x PBS (basische Lösung)	1 PBS-Tablette (Sigma-Aldrich) 20 mL Milli-Q-Wasser
1x PBS aus 10x PBS	10 mM Phosphatpuffer 2,7 mM KCl 137 mM NaCl pH 7,4 (25 °C)

5 M Guanidinhydrochlorid	5 M Guanidin-HCl in PBS (1x)
300 mM DTT	300 mM Dithiothreitol in PBS (1x)
300 mM IAA	300 mM Iodacetamid in PBS (1x)
300 mM Acrylamid	300 mM Acrylamid in PBS (1x)
1 µg/µL Proteomics-Grade-Trypsin-Lösung	20 µg Trypsin pro Ampulle 20 µL 50 mM Essigsäure
10 µg/µL Rindertrypsin-Lösung	5 mg Rindertrypsin 0,5 mL 50 mM Essigsäure
Saure Lösung	0,1 % TFA
<b>Aminosäureanalytik:</b>	
Lösung des Referenzmaterials	3 mg L-Aminosäure (1,5-4 mmol) 30 mL Milli-Q-Wasser
Aminosäure-Spikelösung	1 mg Aminosäure-Spike (markiert) 10 mL Milli-Q-Wasser

**6.4.11. Geräte**

Analysenwaage (AC 211 S, max. 210 g)	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Göttingen)
Analysenwaage (MC5, max. 5,1 g)	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Göttingen)
Analysenwaage (Kern, 3,5 kg)	KERN & SOHN GmbH (Balingen-Frommern)
ChemiDoc Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR PX1 PCR Plate Sealer	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR QX200 droplet generator	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR QX200 droplet reader	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
EVOS FL Color Imaging System	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Eppendorf Thermomixer (1,5 mL/ 2 mL)	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Mastercycler Gradient Thermal Cycler	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Mastercycler Thermal Cycler	Eppendorf AG (Hamburg)
Flachschüttler KS130 basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
HERA Cell 150i; CO <sub>2</sub> Inkubator (Brutschrank)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HERA SAFE KSP Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Kühlfalle (CT 04-50 SR)	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode)
Magnetrührer RCT basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Metallblock-Thermostat	VLM (Bielefeld)
MPS DualHead Robotersystem	Gerstel GmbH & Co. KG (Mühlheim)
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	peqlab GmbH (Erlangen)
Nikon Eclipse TS100 (inverses Mikroskop)	Nikon Instruments Europe B.V. (Amsterdam, Niederlande)
pH-Meter	Schott AG (Mainz)
Plattenlesegerät Synergy™ H4 Hybrid Reader	BioTek Instruments GmbH (Bad Friedrichshall)
Rollenmischgerät	VWR International GmbH (Darmstadt)
Rotations-Vakuum-Konzentrator (RVC 2-33 IR)	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode)
Rotor-Gene Q (qPCR-Cycler)	Qiagen GmbH (Düsseldorf)
Schüttler Vibramax 100T	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach)
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Scientific (Langenselbold)
Trans-Blot Turbo Transfer System (Blotting)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Transmissionselektronenmikroskop TEM910	Carl Zeiss AG (Oberkochen)

Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronics (Berlin)
Ultrazentrifuge Optima L-80XP (Rotor: SW-32 Ti)	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Vakuumextraktionskammer Visiprep DL	Supelco Inc, (Bellefonte, USA)
Vortex-Mixer IKA MS3 basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Wasserbad	ROWA Labortechn. Analgen GmbH (Heimsheim)
Zellzahl-Messgerät Z2 Coulter Counter	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Zentrifuge Biofuge 15R (1,5/ 2 mL, RG, LC-Vials)	Heraeus Sepatech (Osterode)
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R (50 mL)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge MicroStar12-VWR (1,5/ 2 mL)	Labogene (Dänemark)

**Tabelle 28: HPLC-Analgen**

HPLC	Hersteller
Agilent™ 1100 Series LC	Agilent Technologies Inc. (Waldbronn)
Agilent™ 1200 Series LC	Agilent Technologies Inc. (Waldbronn)
VWR Hitachi Chromaster	VWR International GmbH (Darmstadt)

**Tabelle 29: Massenspektrometer**

Massenspektrometer	Hersteller
LTQ Orbitrap Elite	Thermo Fisher Scientific (Bremen)
LC-1100-MSD	Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, USA)

**6.4.12. Verbrauchsmaterialien und Laborbedarf**

Alu-Laborfolie Universal	Korff AG (Oberbipp)
Bechergläser	Duran Group GmbH (Wertheim/ Main)
CELLSTAR serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen)
Chromabond C18/ C4 ec (3 mL/ 500 mg)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
Cryo Tube Vials (Kryoröhrchen)	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
ddPCR DG8 cartridge	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR DG8 cartridge holder	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR DG8 gaskets	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR pierceable foil heat seals	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ddPCR DG8 96 well plates	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Einweghandschuhe (nitril)	UvecSafety GmbH & Co. KG (Lüneburg)
Eppendorf Thermomixer (1,5/2 mL)	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf-Tubes (0,2/0,5/1,5/2 mL)	Eppendorf AG (Hamburg)
Erlenmeyerkolben	Duran Group GmbH (Wertheim/ Main)
Falconröhrchen (15/50 mL)	VWR International GmbH (Darmstadt)
Fluss-Kontrolleinsatz (Visiprep DL)	Supelco Inc, (Bellefonte, USA)
Glasgefäße mit Deckel (7/15/40 mL)	Supelco Inc, (Bellefonte, USA)
LC-Glas-Vials mit Deckel und Septen	Chromat. Service GmbH (Langerwehe)
LC-Plastik-Vials mit Deckel und Septen	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen)
LC-Vial-Inserts (50/250 µL)	Chromat. Service GmbH (Langerwehe)
Magnetrührstäbchen	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim/ Main)
Messzylinder	Duran Group GmbH (Wertheim/ Main)
Millipore Ultrafree-MC-Filter-Einheit (0,45 µm)	Merck KGaA (Darmstadt)
Mini-Protean Tetra cell (Elektrophoresekommer)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Mini-Protean TGX Stain-free gels (4-15%)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondheim)
Parafilm	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Pasteur-Pipetten	Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe)
pH-Indikatorstreifen	Merck KGaA (Darmstadt)
Pipet-Boy	VWR International GmbH (Darmstadt)
Pipetten (10/20/100/200/1000/5000 µL)	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipetten-Spitzen	Eppendorf AG (Hamburg)
Plastikküvetten	VWR International GmbH (Darmstadt)
Polypropylene Centrifuge Tubes (25x89 mm)	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Reagenzgläser	Duran Group GmbH (Wertheim/ Main)

Schottflaschen (0,2/0,5/1/2 L)	Duran Group GmbH (Wertheim/ Main)
Spatel, Löffel, Pinzette	VWR International GmbH (Darmstadt)
Transferpette-12 (10-100 µL)	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim/ Main)
Uhrgläser	Duran Group GmbH (Wertheim/ Main)
Vakuum-Hydrolyse-Röhrchen	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Z2 Coulter Counter Tubes	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Zellkulturplastikartikel (Flaschen, 96-well-Platten)	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)

**Tabelle 30: HPLC-Säulen**

Beschreibung	Eigenschaften	Verwendung	Hersteller
SeQuant-ZIC-HILIC	3,5 µm; 150 x 2,1 mm	analytisch	Merck KGaA (Darmstadt)
ZIC-HILIC Optiguard	5 µm; 10 x 1 mm	Vorsäule	
Jupiter C4 300 Å	150 x 2 mm, 5 micron	analytisch	Phenomenex Inc., Torrance, USA
Security Guard Cartridge	Widopore C4, 4 x 2 mm	Vorsäule	
Jupiter C18 300 Å	150 x 2 mm, 5 micron	analytisch	Phenomenex Inc., Torrance, USA
	250 x 10 mm, 5 micron	präparativ	
Security Guard Cartridge	Widopore C18, 4 x 2 mm	Vorsäule	
Luna SCX 100 Å	250 x 10 mm, 5 micron	präparativ	Phenomenex Inc., Torrance, USA
Security Guard Cartridge	SCX, 4 x 2 mm	Vorsäule	

### 6.4.13. Software und Datenbanken

EZChrom Elite Version 3.3.2 SP2	VWR International GmbH (Darmstadt)
GUM Workbench Professional 2.4.	Metrodata GmbH (Braunschweig)
Image Lab 5.2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Los Alamos HIV Sequenzdatenbank	<a href="http://www.hiv.lanl.gov/">http://www.hiv.lanl.gov/</a>
Microsoft Office 2010 (Word/Excel/Powerpoint)	Microsoft GmbH
NCBI/Primer-BLAST	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast</a>
OligoAnalyzer 3.1	<a href="https://eu.idtdna.com/calc/analyzer">https://eu.idtdna.com/calc/analyzer</a>
PrimerQuest Tool	<a href="https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index">https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index</a>
ProteinProspector v5.17.1	UCSF, San Francisco
Proteome Discoverer	Thermo Fisher Scientific (Bremen)
Thermo Orbitrap Elite™ 2.7 (Xcalibur 2.2)	Thermo Fisher Scientific (Bremen)
UniProtKB Datenbank	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>

## 6.5. Ergebnisteil

### 6.5.1. HIV-Inaktivierung

Um mit den präparierten infektiösen HIV-Proben auch außerhalb der Sicherheitsstufe 3 arbeiten zu können, wurden verschiedene Inaktivierungsprotokolle für die Protein- und RNA-Analytik getestet und validiert. Die Inaktivierungsmaßnahme gilt als validiert, sobald das Inaktivierungsprotokoll dreimal unabhängig voneinander als erfolgreich getestet wurde. Eine Einzeltestung der Proben nach der Inaktivierung ist dann nicht mehr erforderlich. Die Inaktivierung des Virusmaterials wurde mit dem TCID<sub>50</sub>-Assay (siehe Abschnitt 3.1.6 „Virustitration (TCID<sub>50</sub>-Assay)“, Seite 29) überprüft und gilt als erfolgreich, wenn kein infektiöser Titer nachzuweisen ist. Die Inaktivierungsprotokolle und die Ergebnisse der Validierung sind in der nachfolgenden Tabelle 31 aufgelistet.

Tabelle 31: Ergebnis der Validierung von HIV-Inaktivierungsprotokollen.

Protokoll	Inaktivierungsbedingungen	Validierung*
1)	Lösen des Viruspellets in: 8 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris (HCl+Base), 5 mM DTT; Inkubation für 30 min bei 60 °C	✗
2)	Lösen des Viruspellets in: 80 % Acetonitril, 50 mM Tris (HCl+Base), 5 mM DTT; Inkubation für 30 min bei 60 °C	✓
3)	Lösen des Viruspellets in: 80 % Ethanol (EtOH), 50 mM Tris (HCl+Base), 5 mM DTT; Inkubation für 30 min bei 60 °C	✓
4)	Inkubation von 140 µL Virussuspension für 1 h bei 60 °C	✓
5)	Inkubation von 500 µL Virussuspension für 1 h bei 60 °C	✓
6)	Inkubation von 1000 µL Virussuspension für 1 h bei 60 °C	✗
7)	RNA-Extraktion aus Virusmaterial (QIAamp Viral RNA Mini Kit)	✓

\*dreimal unabhängige und erfolgreiche Testung der Inaktivierung

Für die HIV-Protein-Analytik mittels Massenspektrometrie wurden drei verschiedene Reagenzien für die chemische Inaktivierung von HIV-Pellets getestet: Guanidinhydrochlorid, Acetonitril und Ethanol (Protokoll 1-3, Tabelle 31). Für die Inaktivierung von HIV-Virus-suspensionen wurden verschiedene Volumina 140 µL, 500 µL, 1000 µL in 1,5 mL Eppendorfgläser für 1 h bei 60 °C in einem Heizblock inkubiert (Protokoll 4-6, Tabelle 31). Die eingesetzten Reagenzien für die chemische Inaktivierung sind kompatibel zur Massenspektrometrie und haben keinen negativen Einfluss auf die Ionisierung der Analyten, da sie leicht vor der Analyse aus den Proben entfernt werden können. Das typische chaotrope Denaturierungsmittel für Proteine „Guanidinhydrochlorid“ lagert sich an den denaturierten Zustand des Proteins an und stabilisiert diesen durch Solubilisierung. Für die massenspektrometrische Analyse kann das Salz leicht über Festphasenextraktion entfernt werden. Auch organische Lösungsmittel wie Ethanol und Acetonitril können einen Inaktivierungseffekt ausüben, da sie eine Proteinfällung bewirken können und konzentrationsabhängig auch eine Entfaltung von Proteinstrukturen. Ein Vorteil ist, dass organische Lösungsmittel sehr leicht und nahezu vollständig über eine Vakuumzentrifuge aus dem Probenmaterial entfernt werden können. Für die Inaktivierung wurde das nach der Ultrazentrifugation erhaltene Viruspellet sorgfältig und vollständig in das entsprechende Inaktivierungsreagenz aufgelöst und direkt in ein frisches 1,5 mL Eppendorf-Gefäß transferiert. Zusätzlich wurden die Proben für 30 min bei 60 °C inkubiert. Vor der anschließenden Testung der Inaktivierung mithilfe des TCID<sub>50</sub>-Assays war es notwendig die starken Denaturierungsmittel vom Virusmaterial abzutrennen, um sicher zu



gehen, dass die für den Assay eingesetzten Zellen nicht vom Denaturierungsmittel beeinflusst werden und ihre Aktivität verlieren. Dazu wurde das inaktivierte Material in PBS aufgenommen, erneut untrazentriert und die Reagenzien-enthaltene Lösung vom Viruspellet entfernt. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die pelletierten denaturierten Virusbestandteile wurden in 1 mL PBS aufgenommen und anschließend nach dem Protokoll des TCID<sub>50</sub>-Assays getestet. Die Ergebnisse zur Validierung der chemischen HIV-Inaktivierung zeigten, dass die Inaktivierung nur mit den organischen Lösungsmitteln (Protokoll 2 und 3) erfolgreich war. Dagegen zeigte der Infektionsassay für die Inaktivierung mit Guanidinhydrochlorid kein eindeutig negatives Ergebnis (Protokoll 1).

Die Hitzeinaktivierung von HIV-Virussuspensionen verlief für alle drei getesteten Virusvolumina insgesamt positiv. Da das Ergebnis für 1000 µL Virussuspension im Vergleich zu den geringeren Volumina von 140 µL und 500 µL tendenziell abwich, wurde Protokoll 6 als nicht validiert gewertet. Deshalb gilt nur Protokoll 4 und 5 als validiert, weshalb die Hitzeinaktivierung von Virussuspensionen nur bis zu einem maximalen Volumen von 500 µL durchgeführt wurde. Dieses Verfahren wurde letztendlich für die Quantifizierung der HIV-Proteine im Probenmaterial angewendet.

Für die HIV-RNA-Analytik ist es notwendig die RNA intakt aus den Viruspartikeln zu isolieren, da RNA sehr anfällig für einen RNase-Verdau ist. Deshalb wurde für die RNA-Extraktion ein kommerziell erhältliches Kit „QIAamp Viral RNA Mini Kit“ (Qiagen) verwendet (siehe Abschnitt 3.3.1 „Extraktion von viraler RNA“, Seite 31). Dafür wurden unterschiedliche HIV-Volumina (1 mL, 10 mL und 20 mL) aufkonzentriert und die RNA aus dem Pellet oder aus einem Maximalvolumen von 140 µL Virussuspension extrahiert und auf Infektiosität getestet (Protokoll 7). Die extrahierte RNA zeigte eindeutig und unabhängig von der eingesetzten Virusmenge keine Infektiosität mehr auf. Demnach konnte nach der Extraktion der viralen RNA aus dem Virusmaterial, diese problemlos außerhalb des S3-Bereichs weiterverarbeitet werden.

## 6.5.2. Precursor- und Fragmentionen

Tabelle 32: *m/z*-Werte für Precursor- und intensivsten Fragmentionen

Peptidsequenz	<i>m/z</i> Precursor-Ion	<i>m/z</i> Fragment-Ion
HIVWASR (natürlich)	434,743 <sup>+2</sup>	618,336 y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
HIVWASR* ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> -R*)	439,747 <sup>+2</sup>	628,344 y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
TLNAWVK (natürlich)	416,240 <sup>+2</sup>	617,341 y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
TLNAWVK ( <sup>15</sup> N-markiert)	421,225 <sup>+2</sup>	625,317 y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
TLNAWVK* ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -K*)	420,247 <sup>+2</sup>	625,355 y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
WIILGLNK (natürlich)	478,800 <sup>+2</sup>	657,429 y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
WIILGLNK ( <sup>15</sup> N-markiert)	484,284 <sup>+2</sup>	665,406 y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
MYSPTSILDIR (natürlich)	648,337 <sup>+2</sup>	492,280 y <sub>9</sub> -H <sub>2</sub> O <sup>2+</sup>
MYSPTSILDIR ( <sup>15</sup> N-markiert)	655,316 <sup>+2</sup>	498,262 y <sub>9</sub> -H <sub>2</sub> O <sup>2+</sup>
SLFGNDPSSQ (natürlich)	526,238 <sup>+2</sup>	634,283 b <sub>6</sub> <sup>+</sup>
SLF*GNDPSSQ ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> -F*)	531,242 <sup>+2</sup>	644,291 b <sub>6</sub> <sup>+</sup>

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abbott A, Brumfiel G. Nobel for AIDS virus discovery, finally. *Nature*. 2008;455(7214):712–713.
2. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011;1(1):a006841.
3. Deeks SG, Lewin SR, Ross AL, Ananworanich J, Benkirane M, Cannon P, Chomont N, Douek D, Lifson JD, Lo Y-R, Kuritzkes D, Margolis D, Mellors J, Persaud D, Tucker JD, Barre-Sinoussi F, Alter G, Auerbach J, Autran B, Barouch DH, Behrens G, Cavazzana M, Chen Z, Cohen ÉA, Corbelli GM, Eholié S, Eyal N, Fidler S, Garcia L, Grossman C, Henderson G, Henrich TJ, Jefferys R, Kiem H-P, McCune J, Moodley K, Newman PA, Nijhuis M, Nsubuga MS, Ott M, Palmer S, Richman D, Saez-Cirion A, Sharp M, Siliciano J, Silvestri G, Singh J, Spire B, Taylor J, Tolstrup M, Valente S, van Lunzen J, Walensky R, Wilson I, Zack J. International AIDS Society global scientific strategy: Towards an HIV cure 2016. *Nat. Med.* 2016;22(8):839–850.
4. Thomas JA, Ott DE, Gorelick RJ. Efficiency of human immunodeficiency virus type 1 postentry infection processes: Evidence against disproportionate numbers of defective virions. *J. Virol.* 2007;81(8):4367–4370.
5. Gullett JC, Nolte FS. Quantitative nucleic acid amplification methods for viral infections. *Clin. Chem.* 2015;61(1):72–78.
6. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *CMI*. 2004;10(3):190–212.
7. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(6):1292–1305.
8. Sollis KA, Smit PW, Fiscus S, Ford N, Vitoria M, Essajee S, Barnett D, Cheng B, Crowe SM, Denny T, Landay A, Stevens W, Habiya Mbere V, Perrins J, Peeling RW. Systematic review of the performance of HIV viral load technologies on plasma samples. *PloS one*. 2014;9(2):e85869.
9. Holden MJ, Madej RM, Minor P, Kalman LV. Molecular diagnostics: harmonization through reference materials, documentary standards and proficiency testing. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2011;11(7):741–755.
10. Bundesärztekammer. Neufassung der "Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen - Rili-BÄK". 2014.
11. BIPM. Comité Consultatif pour la Quantité de Matière (CCQM): Report of 4th meeting (1998).
12. Pavšič J, Devonshire AS, Parkes H, Schimmel H, Foy CA, Karczmarczyk M, Gutiérrez-Aguirre I, Honeyborne I, Huggett JF, McHugh TD, Milavec M, Zeichhardt H, Žel J. Standardization of Nucleic Acid Tests for Clinical Measurements of Bacteria and Viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2015;53(7):2008–2014.
13. INSTAND. Bericht zum Ringversuch Gruppe 360 Virusgenom-Nachweis-HIV-1 (RNA) - März 2018. 2018.
14. Ringversuche von INSTAND. [https://www.instand-ev.de/no\\_cache/ringversuche-online/ringversuche-service/](https://www.instand-ev.de/no_cache/ringversuche-online/ringversuche-service/). [Accessed 4 February 2019].
15. Hayden RT, Yan X, Wick MT, Rodriguez AB, Xiong X, Ginocchio CC, Mitchell MJ, Caliendo AM. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: A multivariate analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(2):337–345.

16. Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification. *PloS one*. 2013;8(9):e75296.
17. Yang G, Erdman DE, Kodani M, Kools J, Bowen MD, Fields BS. Comparison of commercial systems for extraction of nucleic acids from DNA/RNA respiratory pathogens. *J. Virol. Methods*. 2011;171(1):195–199.
18. Esona MD, McDonald S, Kamili S, Kerin T, Gautam R, Bowen MD. Comparative evaluation of commercially available manual and automated nucleic acid extraction methods for rotavirus RNA detection in stools. *J. Virol. Methods*. 2013;194(1-2):242–249.
19. White GH. Metrological traceability in clinical biochemistry. *Ann. Clin. Biochem*. 2011;48(5):393–409.
20. Hayden RT, Sun Y, Tang L, Procop GW, Hillyard DR, Pinsky BA, Young SA, Caliendo AM. Progress in Quantitative Viral Load Testing: Variability and Impact of the WHO Quantitative International Standards. *J. Clin. Microbiol*. 2017;55(2):423–430.
21. Madej RM, Davis J, Holden MJ, Kwang S, Labourier E, Schneider GJ. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing. *JMD*. 2010;12(2):133–143.
22. International Organization for Standardization. In vitro diagnostic medical devices -- Measurement of quantities in biological samples -- Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials: International standard ISO 17511:2003. 2003.
23. Bhat S, Curach N, Mostyn T, Bains GS, Griffiths KR, Emslie KR. Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Anal. Chem*. 2010;82(17):7185–7192.
24. Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, Jerome KR. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin. Chem*. 2013;59(11):1670–1672.
25. Nixon G, Garson JA, Grant P, Nastouli E, Foy CA, Huggett JF. Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification assays for quantification of human cytomegalovirus. *Anal. Chem*. 2014;86(9):4387–4394.
26. Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S, Caliendo AM. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol*. 2013;51(2):540–546.
27. Rački N, Morisset D, Gutierrez-Aguirre I, Ravnikar M. One-step RT-droplet digital PCR: A breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. *Anal. Bioanal. Chem*. 2014;406(3):661–667.
28. Tang H, Cai Q, Li H, Hu P. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantification of hepatitis B virus DNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2016:1–6.
29. Henrich TJ, Gallien S, Li JZ, Pereyra F, Kuritzkes DR. Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR. *J. Virol. Methods*. 2012;186(1-2):68–72.
30. Strain MC, Lada SM, Luong T, Rought SE, Gianella S, Terry VH, Spina CA, Woelk CH, Richman DD. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PloS one*. 2013;8(4):e55943.
31. Dong L, Meng Y, Sui Z, Wang J, Wu L, Fu B. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Sci. Rep*. 2015;5:13174.
32. Haynes RJ, Kline MC, Toman B, Scott C, Wallace P, Butler JM, Holden MJ. Standard reference material 2366 for measurement of human cytomegalovirus DNA. *JMD*. 2013;15(2):177–185.

33. White H, Deprez L, Corbisier P, Hall V, Lin F, Mazoua S, Trapmann S, Aggerholm A, Andrikovics H, Akiki S, Barbany G, Boeckx N, Bench A, Catherwood M, Cayuela J-M, Chudleigh S, Clench T, Colomer D, Daraio F, Dulucq S, Farrugia J, Fletcher L, Foroni L, Ganderton R, Gerrard G, Gineikienė E, Hayette S, El Housni H, Izzo B, Jansson M, Johnels P, Jurcek T, Kairisto V, Kizilers A, Kim D-W, Lange T, Lion T, Polakova KM, Martinelli G, McCarron S, Merle PA, Milner B, Mitterbauer-Hohendanner G, Nagar M, Nickless G, Nomdedéu J, Nymoen DA, Leibundgut EO, Ozbek U, Pajič T, Pfeifer H, Preudhomme C, Raudsepp K, Romeo G, Sacha T, Talmaci R, Touloumenidou T, van der Velden VHJ, Waits P, Wang L, Wilkinson E, Wilson G, Wren D, Zadro R, Ziermann J, Zoi K, Müller MC, Hochhaus A, Schimmel H, Cross NCP, Emons H. A certified plasmid reference material for the standardisation of BCR-ABL1 mRNA quantification by real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2015;29(2):369–376.
34. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin. Chem.* 2015;61(1):79–88.
35. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, Hellemans J, Kubista M, Mueller RD, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, Bustin SA. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin. Chem.* 2013;59(6):892–902.
36. Hashemi P, Luckau L, Mischnick P, Schmidt S, Stosch R, Wünsch B. Biomacromolecules as tools and objects in nanometrology—current challenges and perspectives. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017;409(25):5901–5909.
37. Bièvre P de. SAC 92. Isotope dilution mass spectrometry as a primary method of analysis. *Anal. Proc.* 1993;30(8):328–333.
38. Bièvre P de, Peiser HS. Basic equations and uncertainties in isotope-dilution mass spectrometry for traceability to SI of values obtained by this primary method. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997;359(7-8):523–525.
39. Rauh M. LC-MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry. *J. Chromatogr. B.* 2012;883-884:59–67.
40. Mayya V, K HD. Proteomic applications of protein quantification by isotope-dilution mass spectrometry. *Expert Rev. Proteomics.* 2006;3(6):597–610.
41. Kaiser P, Akerboom T, Ohlendorf R, Reinauer H. Liquid Chromatography-Isotope Dilution-Mass Spectrometry as a New Basis for the Reference Measurement Procedure for Hemoglobin A1c Determination. *Clin. Chem.* 2010;56(5):750–754.
42. Bowers GN, JR, Fassett JD, White E, 5th. Isotope dilution mass spectrometry and the National Reference System. *Anal. Chem.* 1993;65(12):475–479.
43. HIV/AIDS: Key facts. *World Health Organization*. 2018.
44. HIV-Arbeitskreis Südwest. *HIV und AIDS: Ein Leitfaden für Ärzte, Apotheker, Helfer und Betroffene*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003.
45. Haverkos HW, Curran JW. The current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *CA: Cancer J. Clin.* 1982;32(6):330–339.
46. Centers for Disease Control and Prevention. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1981;30(25):305–308.
47. Centers for Disease Control and Prevention. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1982;31(37):507-8, 513-4.
48. Hoffmann C, Rockstroh JK, editors. *Das HIV-Buch: HIV 2016/2017*. Hamburg: Medizin Fokus Verlag, 2016.

49. Trickey A, May MT, Vehreschild J-J, Obel N, Gill MJ, Crane HM, Boesecke C, Patterson S, Grabar S, Cazanave C, Cavassini M, Shepherd L, Monforte Ad'A, van Sighem A, Saag M, Lampe F, Hernando V, Montero M, Zangerle R, Justice AC, Sterling T, Ingle SM, Sterne JAC. Survival of HIV-positive patients starting antiretroviral therapy between 1996 and 2013: A collaborative analysis of cohort studies. *The Lancet HIV*. 2017;4(8):349-356.
50. Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann. Intern. Med.* 1997;126(12):946–954.
51. O'Brien WA. Changes in plasma HIV RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy and therapeutic failure. *Ann. Intern. Med.* 1997;126(12):939.
52. Gonda MA. Molecular genetics and structure of the human immunodeficiency virus. *J. Electron Microsc. Tech.* 1988;8(1):17–40.
53. Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 1991;5(10):2349–2360.
54. Gelderblom HR, zel M, Pauli G. Morphogenesis and morphology of HIV structure-function relations. *Arch. Virol.* 1989;106(1-2):1–13.
55. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008;18(2):203–217.
56. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* 2001;26(1-6):13–33.
57. Briggs JAG, Kräusslich H-G. The molecular architecture of HIV. *J. Mol. Biol.* 2011; 410(4):491–500.
58. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*. 1988;331(6153):280–283.
59. Paulus C, Ludwig C, Wagner R. Contribution of the Gag-Pol transframe domain p6\* and its coding sequence to morphogenesis and replication of human immunodeficiency virus type 1. *Virology*. 2004;330(1):271–283.
60. Welker R, Kottler H, Kalbitzer HR, Kräusslich HG. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology*. 1996;219(1):228–236.
61. Chertova E, Bess JW, JR, Crise BJ, Sowder II RC, Schaden TM, Hilburn JM, Hoxie JA, Benveniste RE, Lifson JD, Henderson LE, Arthur LO. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 2002;76(11):5315–5325.
62. Zhu P, Chertova E, Bess J, JR, Lifson JD, Arthur LO, Liu J, Taylor KA, Roux KH. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;100(26):15812–15817.
63. Campbell S, Rein A. Assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J. Virol.* 1999(73):2270–2279.
64. Carlson L-A, Briggs JAG, Glass B, Riches JD, Simon MN, Johnson MC, Müller B, Grünwald K, Kräusslich H-G. Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell host & microbe*. 2008;4(6):592–599.
65. Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, Rabin L, Banapour B, Chakrabarti S, Moss B, Wong-Staal F, Steimer KS, Engleman EG. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature*. 1986;323(6090):725–728.

- 
66. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:657–700.
  67. Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guests with master keys: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology.* 1997;235(2):179–190.
  68. O'Brien WA, Koyanagi Y, Namazie A, Zhao JQ, Diagne A, Idler K, Zack JA, Chen IS. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature.* 1990;348(6296):69–73.
  69. Telesnitsky A, Goff SP. Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1997.
  70. Farnet CM, Bushman FD. HIV cDNA integration: Molecular biology and inhibitor development. *AIDS.* 1996;10 Suppl A:S3-11.
  71. Wei SQ, Mizuuchi K, Craigie R. A large nucleoprotein assembly at the ends of the viral DNA mediates retroviral DNA integration. *EMBO J.* 1997;16(24):7511–7520.
  72. Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A, Debouk C, Gallo RC. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature.* 1986;320(6060):367–371.
  73. Dayton AI, Sodroski JG, Rosen CA, Goh WC, Haseltine WA. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell.* 1986;44(6):941–947.
  74. Stoltzfus CM. Chapter 1 Regulation of HIV-1 alternative RNA splicing and its role in virus replication. In: Shatkin AJ, Murphy FA, Maramorosch K, editors. *Adv. Virus Res.* 2009;74:1–40.
  75. Purcell DF, Martin MA. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* 1993;67(11):6365–6378.
  76. Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* 1998;52:491–532.
  77. Siddhartha A.K. Datta and Alan Rein. Preparation of recombinant HIV-1 Gag protein and assembly of virus-like particles in vitro. *Methods. Mol. Biol.* 2009(485):197–208.
  78. Sundquist WI, Krausslich H-G. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(7):a006924.
  79. Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO. Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004;101(41):14889–14894.
  80. Mammano F, Ohagen A, Höglund S, Göttlinger HG. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J. Virol.* 1994;68(8):4927–4936.
  81. Amarasinghe GK, Guzman RN de, Turner RB, Chancellor KJ, Wu ZR, Summers MF. NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J. Mol. Biol.* 2000;301(2):491–511.
  82. Guzman RN de, Wu ZR, Stalling CC, Pappalardo L, Borer PN, Summers MF. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science (N. Y.).* 1998;279(5349):384–388.
  83. Morellet N, Déméné H, Teilleux V, Huynh-Dinh T, Rocquigny H de, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. Structure of the complex between the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 and the single-stranded pentanucleotide d(ACGCC). *J. Mol. Biol.* 1998;283(2):419–434.
  84. Checkley MA, Luttge BG, Freed EO. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J. Mol. Biol.* 2011;410(4):582–608.

85. Hurley JH, Boura E, Carlson L-A, Różycki B. Membrane budding. *Cell*. 2010;143(6): 875–887.
86. Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* 1995;69(11):6810–6818.
87. Göttlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991;88(8):3195–3199.
88. Carlton JG, Martin-Serrano J. The ESCRT machinery: New functions in viral and cellular biology. *Biochem. Soc. Trans.* 2009;37(1):195–199.
89. Weiss ER, Göttlinger H. The role of cellular factors in promoting HIV budding. *J. Mol. Biol.* 2011;410(4):525–533.
90. Pornillos O, Alam SL, Davis DR, Sundquist WI. Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat. Struct. Biol.* 2002;9(11): 812–817.
91. Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, Scolnick EM, Sigal IS. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988;85(13):4686–4690.
92. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: Virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science (N. Y.)*. 1996;271(5255):1582–1586.
93. Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ, Whetsell AJ, Furtado MR, Cao Y, Ho DD, Safrin JT. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science (N. Y.)*. 1996;272(5261):537–542.
94. Chen HY, Di Mascio M, Perelson AS, Ho DD, Zhang L. Determination of virus burst size in vivo using a single-cycle SIV in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; 104(48):19079–19084.
95. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995; 373(6510):123–126.
96. Temin HM. Retrovirus variation and reverse transcription: Abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993;90(15):6900–6903.
97. Pathak VK, Hu W-S. “Might as Well Jump! :” Template Switching by Retroviral Reverse Transcriptase, Defective Genome Formation, and Recombination. *Sem. Virol.* 1997; 8(2):141–150.
98. Delviks-Frankenberry K, Galli A, Nikolaitchik O, Mens H, Pathak VK, Hu W-S. Mechanisms and factors that influence high frequency retroviral recombination. *Viruses*. 2011;3(9):1650–1680.
99. Eberle J, Gürtler L. HIV types, groups, subtypes and recombinant forms: Errors in replication, selection pressure and quasispecies. *Intervirology*. 2012;55(2):79–83.
100. Johnson PR, Hirsch VM. Genetic variation of simian immunodeficiency viruses in nonhuman primates. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1992;8(3):367–372.
101. Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br. Med. Bull.* 2001; 58:19–42.
102. Santos AF, Soares MA. HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. *Viruses*. 2010; 2(2):503–531.
103. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol. Med.* 2012; 18(3):182–192.



104. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. HIV-1 nomenclature proposal. *Science (N. Y.)*. 2000;288(5463):55–56.
105. <https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp>. 2015. [Accessed 15 February 2019].
106. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*. 1998;24(6):954–958, 960–962.
107. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991;88(16):7276–7280.
108. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N. Y.)*. 1993;11(9):1026–1030.
109. Morley AA. Digital PCR: A brief history. *Biomol. Detect. Quantif.* 2014;1(1):1–2.
110. Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJ. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J. Virol.* 1990;64(2):864–872.
111. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96(16):9236–9241.
112. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 2011;83(22):8604–8610.
113. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez J-C, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nat. Biotechnol.* 1996;14(1):61.
114. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389(4):1017–1031.
115. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science (N. Y.)*. 2006;312(5771):212–217.
116. Ong S-E, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* 2005;1(5):252–262.
117. Brownridge P, Beynon RJ. The importance of the digest: proteolysis and absolute quantification in proteomics. *Methods*. 2011;54(4):351–360.
118. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 1999;17(10):994–999.
119. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics*. 2004;3(12):1154–1169.

120. Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Hamon C. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* 2003;75(8):1895–1904.
121. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics.* 2002;1(5):376–386.
122. Barr JR, Maggio VL, Patterson DG, JR, Cooper GR, Henderson LO, Turner WE, Smith SJ, Hannon WH, Needham LL, Sampson EJ. Isotope dilution--mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I. *Clin. Chem.* 1996;42(10):1676–1682.
123. Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;100(12):6940–6945.
124. Kuhn E, Wu J, Karl J, Liao H, Zolg W, Guild B. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and <sup>13</sup>C-labeled peptide standards. *Proteomics.* 2004;4(4):1175–1186.
125. Kettenbach AN, Rush J, Gerber SA. Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides. *Nat. Protoc.* 2011;6(2):175–186.
126. Beynon RJ, Doherty MK, Pratt JM, Gaskell SJ. Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat. Methods.* 2005;2(8):587–589.
127. Rivers J, Simpson DM, Robertson DHL, Gaskell SJ, Beynon RJ. Absolute multiplexed quantitative analysis of protein expression during muscle development using QconCAT. *Mol. Cell. Proteom.* 2007;6(8):1416–1427.
128. Simpson DM, Beynon RJ. QconCATs: Design and expression of concatenated protein standards for multiplexed protein quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012;404(4):977–989.
129. Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M, Vandenesch F, Garin J. Isotope-labeled protein standards: Toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics.* 2007;6(12):2139–2149.
130. Gilquin B, Louwagie M, Jaquinod M, Cez A, Picard G, El Kholy L, Surin B, Garin J, Ferro M, Kofman T, Barau C, Plaisier E, Ronco P, Brun V. Multiplex and accurate quantification of acute kidney injury biomarker candidates in urine using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) and targeted proteomics. *Talanta.* 2017; 164:77–84.
131. Pritchard C, Groves KJ, Biesenbruch S, O'Connor G, Ashcroft AE, Arsene C, Schulze D, Quaglia M. Quantification of human growth hormone in serum with a labeled protein as an internal standard: Essential considerations. *Anal. Chem.* 2014;86(13):6525–6532.
132. Sargent M, Harte R, Harrington C, editors. *Guidelines for achieving high accuracy in isotope dilution mass spectrometry (IDMS)*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.
133. Mackay LG, Taylor CP, Myors RB, Hearn R, King B. High accuracy analysis by isotope dilution mass spectrometry using an iterative exact matching technique. *Accredit. Qual. Assur.* 2003;8(5):191–194.
134. Henrion A. Reduction of systematic errors in quantitative analysis by isotope dilution mass spectrometry (IDMS): An iterative method. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1994; 350(12):657–658.

135. Michalski A, Damoc E, Lange O, Denisov E, Nolting D, Müller M, Viner R, Schwartz J, Remes P, Belford M, Dunyach J-J, Cox J, Horning S, Mann M, Makarov A. Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes. *Mol. Cell. Proteom.* 2012;11(3):O111.013698.
136. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984;11(11):601.
137. McLuckey SA. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom. Chem.* 1992;3(6):599–614.
138. Frese CK, Altelaar AFM, Hennrich ML, Nolting D, Zeller M, Griep-Raming J, Heck AJR, Mohammed S. Improved peptide identification by targeted fragmentation using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J. Proteome Res.* 2011;10(5):2377–2388.
139. Zhang J, Wang Y, Li S. Deuterium isobaric amine-reactive tags for quantitative proteomics. *Anal. Chem.* 2010;82(18):7588–7595.
140. Mischerikow N, van Nierop P, Li KW, Bernstein H-G, Smit AB, Heck AJR, Altelaar AFM. Gaining efficiency by parallel quantification and identification of iTRAQ-labeled peptides using HCD and decision tree guided CID/ETD on an LTQ Orbitrap. *The Analyst.* 2010;135(10):2643–2652.
141. Syka JEP, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004;101(26):9528–9533.
142. Fornelli L, Damoc E, Thomas PM, Kelleher NL, Aizikov K, Denisov E, Makarov A, Tsybin YO. Analysis of intact monoclonal antibody IgG1 by electron transfer dissociation Orbitrap FTMS. *Mol. Cell. Proteom.* 2012;11(12):1758–1767.
143. van den Toorn HWP, Mohammed S, Gouw JW, van Breukelen B, Heck AJR. Targeted SCX Based Peptide Fractionation for Optimal Sequencing by Collision Induced, and Electron Transfer Dissociation. *J. Proteomics Bioinform.* 2008;01(08):379–388.
144. Wiesner J, Premisler T, Sickmann A. Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics.* 2008;8(21):4466–4483.
145. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom. Chem.* 1994;5(11):976–989.
146. Sadygov RG. Using SEQUEST with theoretically complete sequence databases. *J. Am. Soc. Mass Spectrom. Chem.* 2015;26(11):1858–1864.
147. Jeong K, Kim S, Bandeira N. False discovery rates in spectral identification. *BMC bioinformatics.* 2012;13 Suppl 16:S2.
148. Li M, Ramratnam B. Proteomic Characterization of Exosomes from HIV-1-Infected Cells. *Methods. Mol. Biol.* 2016;1354:311–326.
149. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938;27(3):493–497.
150. Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 2006;1(6):2856.
151. Arsene CG, Ohlendorf R, Burkitt W, Pritchard C, Henrion A, O'Connor G, Bunk DM, Guttler B. Protein quantification by isotope dilution mass spectrometry of proteolytic fragments: cleavage rate and accuracy. *Anal. Chem.* 2008;80(11):4154–4160.
152. Milton MJT, Wielgosz RI. Uncertainty in SI-traceable measurements of amount of substance by isotope dilution mass spectrometry. *Metrologia.* 2000;(37):199–206.
153. Burkitt WI, Pritchard C, Arsene C, Henrion A, Bunk D, O'Connor G. Toward Système International d'Unité-traceable protein quantification: From amino acids to proteins. *Anal. Biochem.* 2008;376(2):242–251.

154. Farrance I, Frenkel R. Uncertainty of Measurement: A Review of the Rules for Calculating Uncertainty Components through Functional Relationships. *Clin. Biochem. Rev.* 2012;33(2):49–75.
155. BIPM. Evaluation of Measurement Data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. 2008.
156. BIPM. Evaluation of Measurement Data - An introduction to the "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement" and related documents. 2009.
157. Briggs JAG, Simon MN, Gross I, Krausslich H-G, Fuller SD, Vogt VM, Johnson MC. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004;11(7):672–675.
158. Gupta S, Rawat S, Arora V, Kottarath SK, Dinda AK, Vaishnav PK, Nayak B, Mohanty S. An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2018;9(1):180.
159. Diskussion mit Prof. Dr. Manfred Rohde.
160. Chiou N-T, Ansel KM. Improved exosome isolation by sucrose gradient fractionation of ultracentrifuged crude exosome pellets. *Protocol Exchange.* 2016.
161. Dettenhofer M, Yu XF. Highly purified human immunodeficiency virus type 1 reveals a virtual absence of Vif in virions. *J. Virol.* 1999;73(2):1460–1467.
162. Burnette B, Yu G, Felsted RL. Phosphorylation of HIV-1 gag Proteins by Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 1993;268(12):8698–8703.
163. Cartier C, Sivard P, Tranchat C, Decimo D, Desgranges C, Boyer V. Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid role of phosphorylation during the early steps of infection. *J. Biol. Chem.* 1999;274(27):19434–19440.
164. Hemonnot B, Cartier C, Gay B, Rebuffat S, Bardy M, Devaux C, Boyer V, Briant L. The host cell MAP kinase ERK-2 regulates viral assembly and release by phosphorylating the p6gag protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* 2004;279(31):32426–32434.
165. Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* 2014;11:9.
166. Müller B, Patschinsky T, Kräusslich H-G. The late-domain-containing protein p6 is the predominant phosphoprotein of human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 2002;76(3):1015–1024.
167. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase: UniProtKB - P04591 (GAG\_HV1H2). 2017. <https://www.uniprot.org/uniprot/P04591>. [Accessed 6 December 2018].
168. Invernizzi CF, Xie B, Frankel FA, Feldhammer M, Roy BB, Richard S, Wainberg MA. Arginine methylation of the HIV-1 nucleocapsid protein results in its diminished function. *AIDS.* 2007;21(7):795–805.
169. Gurer C, Berthoux L, Luban J. Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1. *J. Virol.* 2005;79(2):910–917.
170. Gottwein E, Kräusslich H-G. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Ubiquitination. *J. Virol.* 2005;79(14):9134–9144.
171. McKinstry WJ, Hijnen M, Tanwar HS, Sparrow LG, Nagarajan S, Pham ST, Mak J. Expression and purification of soluble recombinant full length HIV-1 Pr55(Gag) protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2014;100:10–18.
172. Luban J, Goff SP. Binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA to recombinant HIV-1 gag polyprotein. *J. Virol.* 1991;65(6):3203–3212.

173. Madisen L, Travis B, Hu S-L, Purchio AF. Expression of the human immunodeficiency virus gag gene in insect cells. *Virology*. 1987;158(1):248–250.
174. Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*. 1989;59(1):103–112.
175. Vlasuk GP, Waxman L, Davis LJ, Dixon RAF, Schultz LD, Hofmann KJ, Tung J-S, Schulman CA, Ellis RW, Bencen GH, Duong LT, Polokoff MA. Purification and characterization of human immunodeficiency virus (HIV) core precursor (p55) expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. 1989;264(20):12106–12112.
176. Gowda SD, Stein BS, Engleman EG. Identification of protein intermediates in the processing of the p55 HIV-1 gag precursor in cells infected with recombinant vaccinia virus. *J. Biol. Chem*. 1989;264(15):8459–8462.
177. Flexner C, Broyles SS, Earl P, Chakrabarti S, Moss B. Characterization of human immunodeficiency virus gag/pol gene products expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology*. 1988;166(2):339–349.
178. Geoghegan KF, Hoth LR, Tan DH, Borzilleri KA, Withka JM, Boyd JG. Cyclization of N-Terminal S-Carbamoylmethylcysteine Causing Loss of 17 Da from Peptides and Extra Peaks in Peptide Maps. *J. Proteome Res*. 2002;1(2):181–187.
179. Jiang X, Shamshurin D, Spicer V, Krokhin OV. The effect of various S-alkylating agents on the chromatographic behavior of cysteine-containing peptides in reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr. B*. 2013;915-916:57–63.
180. Reimer J, Shamshurin D, Harder M, Yamchuk A, Spicer V, Krokhin OV. Effect of cyclization of N-terminal glutamine and carbamidomethyl-cysteine (residues) on the chromatographic behavior of peptides in reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr. A*. 2011;1218(31):5101–5107.
181. Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med*. 2001;7(12):1313–1319.
182. Bachand F, Yao X-J, Hrimech M, Rougeau N, Cohen ÉA. Incorporation of Vpr into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Requires a Direct Interaction with the p6 Domain of the p55 Gag Precursor. *J. Biol. Chem*. 1999;274(13):9083–9091.
183. Fritz JV, Dujardin D, Godet J, Didier P, Mey J de, Darlix J-L, Mély Y, Rocquigny H de. HIV-1 Vpr oligomerization but not that of Gag directs the interaction between Vpr and Gag. *J. Virol*. 2010;84(3):1585–1596.
184. Liu YD, Goetze AM, Bass RB, Flynn GC. N-terminal glutamate to pyroglutamate conversion in vivo for human IgG2 antibodies. *J. Biol. Chem*. 2011;286(13):11211–11217.
185. Xu W, Peng Y, Wang F, Paporello B, Richardson D, Liu H. Method to convert N-terminal glutamine to pyroglutamate for characterization of recombinant monoclonal antibodies. *Anal. Biochem*. 2013;436(1):10–12.
186. Pan S, Aebersold R, Chen R, Rush J, Goodlett DR, McIntosh MW, Zhang J, Brentnall TA. Mass spectrometry based targeted protein quantification: Methods and applications. *J. Proteome Res*. 2009;8(2):787–797.
187. Keshishian H, Addona T, Burgess M, Kuhn E, Carr SA. Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol. Cell Proteomics*. 2007;6(12):2212–2229.
188. Shi T, Su D, Liu T, Tang K, Camp DG, Qian W-J, Smith RD. Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics. *Proteomics*. 2012;12(8):1074–1092.

189. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: A tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 2008;4:222.
190. Gallien S, Kim SY, Domon B. Large-Scale Targeted Proteomics Using Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring (IS-PRM). *Mol. Cell. Proteom.* 2015;14(6):1630–1644.
191. Peterson AC, Russell JD, Bailey DJ, Westphall MS, Coon JJ. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol. Cell. Proteom.* 2012;11(11):1475–1488.
192. Schilling B, MacLean B, Held JM, Sahu AK, Rardin MJ, Sorensen DJ, Peters T, Wolfe AJ, Hunter CL, MacCoss MJ, Gibson BW. Multiplexed, Scheduled, High-Resolution Parallel Reaction Monitoring on a Full Scan QqTOF Instrument with Integrated Data-Dependent and Targeted Mass Spectrometric Workflows. *Anal. Chem.* 2015;87(20):10222–10229.
193. Shi T, Song E, Nie S, Rodland KD, Liu T, Qian W-J, Smith RD. Advances in targeted proteomics and applications to biomedical research. *Proteomics.* 2016;16(15-16):2160–2182.
194. Domon B, Gallien S. Recent advances in targeted proteomics for clinical applications. *Proteomics Clin. Appl.* 2015;9(3-4):423–431.
195. Yates JR, Cociorva D, Liao L, Zabrouskov V. Performance of a linear ion trap-Orbitrap hybrid for peptide analysis. *Anal. Chem.* 2006;78(2):493–500.
196. Majovsky P, Naumann C, Lee C-W, Lassowskat I, Trujillo M, Dissmeyer N, Hoehenwarter W. Targeted proteomics analysis of protein degradation in plant signaling on an LTQ-Orbitrap mass spectrometer. *J. Proteome Res.* 2014;13(10):4246–4258.
197. Venable JD, Wohlschlegel J, McClatchy DB, Park SK, Yates JR. Relative quantification of stable isotope labeled peptides using a linear ion trap-Orbitrap hybrid mass spectrometer. *Anal. Chem.* 2007;79(8):3056–3064.
198. Siepen JA, Keevil E-J, Knight D, Hubbard SJ. Prediction of missed cleavage sites in tryptic peptides aids protein identification in proteomics. *J. Proteome Res.* 2007;6(1):399–408.
199. Yen C-Y, Russell S, Mendoza AM, Meyer-Arendt K, Sun S, Cios KJ, Ahn NG, Resing KA. Improving sensitivity in shotgun proteomics using a peptide-centric database with reduced complexity: Protease cleavage and SCX elution rules from data mining of MS/MS spectra. *Anal. Chem.* 2006;78(4):1071–1084.
200. Wenschuh H, Halada P, Lamer S, Jungblut P, Krause E. The ease of peptide detection by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: The effect of secondary structure on signal intensity. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998;12(3):115–119.
201. Shuford CM, Sederoff RR, Chiang VL, Muddiman DC. Peptide Production and Decay Rates Affect the Quantitative Accuracy of Protein Cleavage Isotope Dilution Mass Spectrometry (PC-IDMS). *Mol. Cell Proteomics.* 2012;11(9):814–823.
202. Ren D, Pipes GD, Liu D, Shih LY, Nichols AC, Treuheit MJ, Brems DN, Bondarenko PV. An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins. *Anal. Biochem.* 2009;392(1):12–21.
203. Šlechtová T, Gilar M, Kalíková K, Tesařová E. Insight into Trypsin Miscleavage: Comparison of Kinetic Constants of Problematic Peptide Sequences. *Anal. Chem.* 2015;87(15):7636–7643.
204. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1967;27(2):157–162.

- 
205. Myerski A, Siegel A, Engstrom J, McGowan I, Brand RM. The Use of Droplet Digital PCR to Quantify HIV-1 Replication in the Colorectal Explant Model. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 2019;35(3):326–334.
  206. Guepi EK. Vollständige Genomanalyse neu identifizierter singulärer HIV-1 Rekombination (URF) aus Oman. *Diplomarbeit*. Berlin, 2015.
  207. Luckau L. Vollständige Genomanalyse einer neuen rekombinanten Form von HIV-1 aus Oman. *Masterarbeit*. Berlin, 2015.
  208. Kiselina M, Pasternak AO, Spiegelaere W de, Vogelaers D, Berkhout B, Vandekerckhove L. Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA. *PloS one*. 2014;9(1):e85999.
  209. Girnary R, King L, Robinson L, Elston R, Brierley I. Structure-function analysis of the ribosomal frameshifting signal of two human immunodeficiency virus type 1 isolates with increased resistance to viral protease inhibitors. *J. Gen. Virol.* 2007;88(1):226–235.
  210. Dulude D, Berchiche YA, Gendron K, Brakier-Gingras L, Heveker N. Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology*. 2006;345(1):127–136.
  211. Chiu H-C, Wang F-D, Chen Y-MA, Wang C-T. Effects of human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6\* mutations on viral protease-mediated Gag processing. *J. Gen. Virol.* 2006;87(7):2041–2046.
  212. Yu F-H, Chou T-A, Liao W-H, Huang K-J, Wang C-T. Gag-Pol Transframe Domain p6\* Is Essential for HIV-1 Protease-Mediated Virus Maturation. *PloS one*. 2015;10(6):e0127974.
  213. Grentzmann G, Ingram JA, Kelly PJ, Gesteland RF, Atkins JF. A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA*. 1998;4(4):479–486.
  214. Plant EP, Dinman JD. Comparative study of the effects of heptameric slippery site composition on -1 frameshifting among different eukaryotic systems. *RNA*. 2006;12(4):666–673.
  215. Brakier-Gingras L, Charbonneau J, Butcher SE. Targeting frameshifting in the human immunodeficiency virus. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2012;16(3):249–258.
  216. Buck CB, Shen X, Egan MA, Pierson TC, Walker CM, Siliciano RF. The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J. Virol.* 2001;75(1):181–191.
  217. Hidalgo L, Swanson CM. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mRNA translation. *Biochem. Soc. Trans.* 2017;45(2):353–364.
  218. Mervis RJ, Ahmad N, Lillehoj EP, Raum MG, Salazar FH, Chan HW, Venkatesan S. The gag gene products of human immunodeficiency virus type 1: Alignment within the gag open reading frame, identification of posttranslational modifications, and evidence for alternative gag precursors. *J. Virol.* 1988;62(11):3993–4002.
  219. Daudé C, Décimo D, Trabaud M-A, André P, Ohlmann T, Breyne S de. HIV-1 sequences isolated from patients promote expression of shorter isoforms of the Gag polyprotein. *Arch. Virol.* 2016;161(12):3495–3507.
  220. Baar MP de, van der Horn KH, Goudsmit J, Ronde A de, Wolf F de. Detection of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 in vitro and in vivo. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37(1):63–67.
  221. Cambridge SB, Gnad F, Nguyen C, Bermejo JL, Krüger M, Mann M. Systems-wide proteomic analysis in mammalian cells reveals conserved, functional protein turnover. *J. Proteome Res.* 2011;10(12):5275–5284.

222. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Corrigendum: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2013;495(7439):126–127.
223. Wolf Fd, Lange JMA, Houweling JTM, Coutinho RA, Scellekens PT, Noordaa Jvd, Goudsmit J. Numbers of CD4+ Cells and the Levels of Core Antigens of and Antibodies to the Human Immunodeficiency Virus as Predictors of AIDS Among Seropositive Homosexual Men. *J. Infect. Dis.* 1988;158(3):615–622.
224. Lange JM, Coutinho RA, Krone WJ, Verdonck LF, Danner SA, van der Noordaa J, Goudsmit J. Distinct IgG recognition patterns during progression of subclinical and clinical infection with lymphadenopathy associated virus/human T lymphotropic virus. *BMJ*. 1986;292(6515):228–230.
225. Jurriaans S, van Gemen B, Weverling GJ, van Strijp D, Nara P, Coutinho R, Koot M, Schuitemaker H, Goudsmit J. The natural history of HIV-1 infection: Virus load and virus phenotype independent determinants of clinical course? *Virology*. 1994;204(1):223–233.
226. Piatak M, JR, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science (N. Y.)*. 1993;259(5102):1749–1754.
227. Layne SP, Merges MJ, Dembo M, Spouge JL, Conley SR, Moore JP, Raina JL, Renz H, Gelderblom HR, Nara PL. Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology*. 1992;189(2):695–714.
228. Bourinbaier AS. HIV and gag. *Nature*. 1991;349(6305):111.
229. Arsene C, Schulze D, Röthke A, Thevis M, Henrion A. Growth hormone isoform-differential mass spectrometry for doping control purposes. *Drug Test. Anal.* 2018;10(6):938–946.
230. Bourinbaier AS. The ratio of defective HIV-1 particles to replication-competent infectious virions. *Acta Virol.* 1994;38(1):59–61.
231. Klasse PJ, McKeating JA. Soluble CD4 and CD4 immunoglobulin-selected HIV-1 variants: A phenotypic characterization. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1993;9(7):595–604.
232. Rusert P, Fischer M, Joos B, Leemann C, Kuster H, Flepp M, Bonhoeffer S, Günthard HF, Trkola A. Quantification of infectious HIV-1 plasma viral load using a boosted in vitro infection protocol. *Virology*. 2004;326(1):113–129.
233. Marozsan AJ, Fraundorf E, Abrahams A, Baird H, Moore D, Troyer R, Nankja I, Arts EJ. Relationships between infectious titer, capsid protein levels, and reverse transcriptase activities of diverse human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* 2004;78(20):11130–11141.
234. Dimitrov DS, Willey RL, Sato H, Chang LJ, Blumenthal R, Martin MA. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *J. Virol.* 1993;67(4):2182–2190.
235. Klasse PJ. Molecular determinants of the ratio of inert to infectious virus particles. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2015;129:285–326.
236. Dianzani F, Antonelli G, Riva E, Turriziani O, Antonelli L, Tying S, Carrasco DA, Lee H, Nguyen D, Pan J, Poast J, Cloyd M, Baron S. Is human immunodeficiency virus RNA load composed of neutralized immune complexes? *J. Infect. Dis.* 2002;185(8):1051–1054.
237. Stoiber H, Kacani L, Speth C, Würzner R, Dierich MP. The supportive role of complement in HIV pathogenesis. *Immunol. Rev.* 2001;180:168–176.
238. Cuccurullo EC, Valentini C, Pizzato M. Retroviral factors promoting infectivity. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2015;129:213–251.



- 239. Hanke S, Besir H, Oesterhelt D, Mann M. Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level. *J. Proteome Res.* 2008;7(3): 1118–1130.
- 240. Brun V, Masselon C, Garin J, Dupuis A. Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *J. Proteom.* 2009;72(5):740–749.
- 241. Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J. Immunol.* 1984;133(1):123–128.
- 242. Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B, Kabat D. Effects of CCR5 and CD4 Cell Surface Concentrations on Infections by Macrophagetropic Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 1998;72(4):2855–2864.
- 243. Platt EJ, Bilska M, Kozak SL, Kabat D, Montefiori DC. Evidence that ecotropic murine leukemia virus contamination in TZM-bl cells does not affect the outcome of neutralizing antibody assays with human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2009;83(16): 8289–8292.
- 244. Takeuchi Y, McClure MO, Pizzato M. Identification of gammaretroviruses constitutively released from cell lines used for human immunodeficiency virus research. *J. Virol.* 2008;82(24):12585–12588.



## Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Mentorin der TU Braunschweig, Frau Prof. Dr. Petra Mischnick, für Ihre außerordentliche und kontinuierliche Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit und vor allem für ihre konstruktiven Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Übernahme des Amtes als Zweitgutachter und für die hilfreichen Diskussionen vor allem zu Beginn meiner Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn Dr. Ralph Golbik für seine Unterstützung und Ratschläge bezüglich der qPCR-Messungen danken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karsten Hiller (TU-Braunschweig) für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Seitens der Physikalisch-Technischen-Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig möchte ich mich vor allem bei Herrn Dr. André Henrion für die Überlassung dieser interessanten Thematik und der Möglichkeit im Bereich der Massenspektrometrie zu arbeiten, bedanken. Dr. Bernd Güttler, Dr. Rainer Stosch und Prof. Dr. Gavin O'Connor danke ich für die hilfreiche Unterstützung des Projekts und Befürwortung meiner Arbeit. Ganz besonders danke ich Christian, Mareike, Anne-Katrin und Herrn Ohlendorf sowie auch meinen früheren Arbeitskollegen Anita, Dirk, Bernd und Madina für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima, für die Unterstützung im Labor und für die wertvollen fachlichen Gespräche. Ebenso danke ich herzlichst Herrn Rüdiger Ohlendorf für die Durchführung der Aminosäure-Analytik.

Bezüglich der ddPCR-Arbeiten danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Macdonald für die Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe in der PTB Berlin. Hierbei danke ich vor allem Frau Dr. Annabell Plauth und Herrn Dr. Andreas Kummrow für die Einarbeitung in die Methode und Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse.

Ganz besonderer Dank gilt den Kollegen des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig, mit deren Unterstützung ich das für das Projekt benötigte HIV-Material herstellen und bearbeiten konnte. In diesem Zusammenhang danke ich Herrn Prof. Dr. Carlos A. Guzmán für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe als Gastwissenschaftlerin. Ich danke vor allem Frau Dr. Stephanie Trittel, Frau Dr. Peggy Riese und Herrn Dr. Kai Schulze für die wissenschaftlichen Diskussionen und der stetig zuverlässig angebotenen Hilfe. Ich danke Ulrike und Hanna für ihre intensive Unterstützung in den Laboratorien und Zellkulturarbeiten sowie für die hierzu unterhaltsamen Gespräche. Ich danke Frau Dr. Susanne Talay für die Möglichkeit in den Laboratorien der Sicherheitsstufe 3 arbeiten zu dürfen, für die Schulungsmaßnahmen sowie für die Orientierungshilfen am Institut. Herrn Prof. Dr. Manfred Rohde möchte ich herzlichst für die elektronenmikroskopischen Analysen und Interpretationen der Aufnahmen danken.

Auch möchte ich mich besonders bei der Graduiertenschule „Braunschweig International School of Metrology“ (B-IGSM) und dem Graduiertenkolleg „Metrology for Complex Nanosystems“ (NanoMet) für die zahlreichen Kontakte, Workshops, Sommerschulen, Meetings sowie für die gemeinsamen außeruniversitären Unternehmungen bedanken.

Abschließend danke ich aus tiefsten Herzen meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und ermutigt haben. Vielen Dank für euer Vertrauen in mich, das mir immer den nötigen Rückhalt gegeben hat.

# Curriculum Vitae

## **Persönliche Daten**

---

Luise Luckau  
luise.luckau@gmx.de  
geboren am 23.09.1990 in Bernburg (Saale), Deutschland

## **Akademische Laufbahn**

---

04/2015 – 07/2019	Promotionsstudium Chemie TU Braunschweig
10/2012 – 11/2014	Masterstudium Biochemie (M.Sc.) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2009 – 09/2012	Bachelorstudium Biochemie (B.Sc.) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## **Berufserfahrung**

---

seit 05/2019	Researcher Mass Spectrometry LGC, Teddington, Großbritannien
04/2015 – 04/2019	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Physikalisch-Technische-Bundesanstalt, Braunschweig
08/2016 – 12/2018	Gastwissenschaftlerin Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig
01/2014 – 11/2014	Forschungsmitarbeiterin für Masterarbeit Robert Koch Institut, Berlin
07/2012 – 12/2013	Wissenschaftliche Assistentin GILUPI GmbH, Potsdam und Halle (Saale)

